

Aus der Universitäts-Hautklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. L. Illig
Abteilung: Andrologie
Leiter: Prof. Dr. W. Meyhöfer

**HALBQUANTITATIVE CYTOPHOTOMETRISCHE
BESTIMMUNGEN VON VERSCHIEDENEN
SUBSTANZEN IN SPERMATOZOEN UND
HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM SAMENEPITHEL DER MAUS
NACH GABE VON CYCLOPHOSPHAMID**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Wolfgang Diehl
aus Asslar
und
Jürgen Gensicke
aus Uslar

Gießen 1972

Aus der Universitäts-Hautklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. L. Illig
Abteilung: Andrologie
Leiter: Prof. Dr. W. Meyhöfer

**HALBQUANTITATIVE CYTOPHOTOMETRISCHE
BESTIMMUNGEN VON VERSCHIEDENEN
SUBSTANZEN IN SPERMATOZOEN UND
HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM SAMENEPITHEL DER MAUS
NACH GABE VON CYCLOPHOSPHAMID**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Wolfgang Diehl
aus Asslar
und
Jürgen Gensicke
aus Uslar

Gießen 1972



Dekan: Professor Dr. Hj. Staudinger
Referent: Professor Dr. W. Meyhöfer
Correferent: Professor Dr. A. Oksche

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Cytostatikum Cyclophosphamid (Endoxan)	3
1.1.1. Chemie	3
1.1.2. Pharmakologie	3
1.2. Allgemeine Gesichtspunkte zur Cytophotometrie und Histologie	5
1.2.1. Cytophotometrie	5
1.2.2. Histologie	6
2. FRAGESTELLUNG	9
3. MATERIAL UND METHODIK	10
3.1. Tiermaterial	10
3.2. Versuchsplan	10
3.3. Dosierung und Applikationsform	12
3.4. Histologie	14
3.4.1. Herstellung der histologischen Präparate	14
3.4.2. Auswertung der histologischen Präparate	15
3.4.3. Messung der Tubulusdurchmesser	16
3.5. Materialentnahme und Herstellung der Ausstrichpräparate	17
3.6. Färbetechniken	20
3.6.1. Die Nuklealfärbung nach Feulgen	20
3.6.2. Die Fastgreen-Färbung	21
3.6.3. Die Sakaguchi-Färbung	22
3.6.4. Die Naphthol-Yellow-Färbung	22
3.7. Durchführung der Messungen	23
3.8. Statistik	25
3.9. In den Tabellen und Darstellungen verwendete Abkürzungen	27

	<u>Seite</u>
4. ERGEBNISSE	29
4. 1. Meßergebnisse der Cytophotometrie	29
4. 2. Varianzanalytische Tabellen der statistisch ausgewerteten Ergebnisse der Cytophotometrie	47
4. 3. Auswertung der histologischen Präparate	51
4. 3. 1. Beurteilung der Spermiogenesezellen	51
4. 3. 2. Messung der Tubulusdurchmesser	58
4. 4. Hodengewichte und ihre statistische Beurteilung	59
5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	61
5. 1. Cytophotometrische Ergebnisse	61
5. 1. 1. Ergebnisse der Feulgen-Färbung	61
5. 1. 2. Ergebnisse der Fastgreen-Färbung	63
5. 1. 3. Ergebnisse der Sakaguchi-Färbung	64
5. 1. 4. Ergebnisse der Naphthol-Yellow-Färbung	65
5. 2. Histologische Ergebnisse	66
5. 2. 1. Spermiogenesezellen	66
5. 2. 2. Durchmesser der Hodentubuli	71
5. 3. Hodengewichte	72
6. DISKUSSION	73
7. ZUSAMMENFASSUNG	86
8. LITERATURVERZEICHNIS	88

1. EINLEITUNG

Die breite Anwendung von Cyclophosphamid in der Klinik fordert genaue und detaillierte Untersuchungen über die Wirkungen, insbesondere aber auch die Nebenwirkungen dieses alkylierenden Cytostaticum.

Berichte über vorläufige Untersuchungsergebnisse bezüglich der Dosierungsproblematik und des Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid auf dem 3. Bielefelder Symposium (H. WILMANN, 1964) können hier als richtungsweisend für die weitere tierexperimentelle und klinische Forschung angesehen werden.

Gerade für Untersuchungen von cytotoxisch wirkenden Substanzen bietet sich das Samenepithel als ein schnell wachsendes Proliferationsgewebe an.

Es war kein Zufall, daß zu den breit angelegten Untersuchungen über Cytostatica parallel verlaufend wissenschaftliche Arbeiten durchgeführt wurden, um den Proliferationsmodus des Samenepithels der Säugetiere aufzuklären.

Da durch Untersuchungen von OAKBERG (1956), MONESI (1961), CLERMONT (1962, 1966), HILSCHER und Mitarb. (1966) detaillierte Kenntnisse über die Spermiogenese verschiedener Versuchstiere vorliegen, sind entsprechende Versuche über die Wirkungen von Cytostatica auf das Samenepithel erfolgversprechend.

So konnten HILSCHER und REICHELT (1968) zeigen, daß bei Dosen von 100 mg pro kg (50 % der LD_{50}) und 200 mg pro kg (95 % der LD_{50}) in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn Kerndegenerationen, Einzelzellnekrosen und Gruppennekrosen auftraten.

Weiterhin wurden Degenerationerscheinungen an runden und elongierten Spermatiden beobachtet. (Befund bei 95 % der Letaldosis).

Diese experimentellen histologischen Untersuchungen werden ergänzt durch die Arbeiten von RINGLEB und Mitarb. RINGLEB sieht in der Gewichtsabnahme von Mäusehoden nach Behandlung mit Cyclophosphamid ein Äquivalent der tubulären Schädigung und Depopulation und somit ein Maß für die germinative Insuffizienz des Hodens nach cytostatischer Behandlung.

Wir gehen von der Überlegung aus, daß die von RINGLEB beschriebenen Hodenatrophien ihre histochemischen und - wie HILSCHER berichtet - ihre histologischen Äquivalente haben müssen.

Da die Arbeiten von RINGLEB und Mitarb. die Frage offen lassen, welche histochemischen und histologischen Veränderungen am Hoden auftreten, war es unser Bestreben, die Skala der Kenntnisse an dieser Stelle zu erweitern. Wir hielten Untersuchungen weiterhin deshalb für wichtig, weil klinisch - therapeutische Fragestellungen Dosierungen in den von RINGLEB angegebenen Größenordnungen zum Gegenstand haben.

In der Mikrospektrophotometrie haben wir eine Methode in der Hand, auch intrazelluläre Substanzen in den dort vorliegenden Mengenverhältnissen bei der Betrachtung einer Einzelzelle quantitativ zu erfassen.

Die mit mikrospektrophotometrischen Methoden bestimmten Substanzmengen sind so gering, daß man sie selbst unter Anwendung der besten chemischen Ultramikroverfahren nicht mehr ermitteln kann (MEYHÖFER, 1962).

Es erschien uns sinnvoll, Spermatozoen von Mäusen auf die Anfärbbarkeit verschiedener Substanzen (DNS, Histonproteine, Gesamtprotein und Arginin) mikrospektrophotometrisch zu messen, um weitere Einblicke in bezug auf die Synthese von Proteinen und Nucleinsäuren zu bekommen.

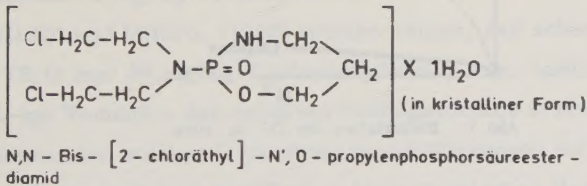
Eine parallelverlaufende histologische Untersuchung der Hodentubuli der gleichen Tiere sollte hier ergänzend wirken.

1.1. DAS CYTOSTATICUM CYCLOPHOSPHAMID (ENDOXAN^R)

1.1.1. CHEMIE

Cyclophosphamid wurde im Jahre 1958 eingeführt.

Die Substanz wurde von BOURSEAUX und ARNOLD synthetisiert und hat folgende Strukturformel:



Cyclophosphamid hat ein MG von 261,08; es bildet als Hydrat mit einem 1 Mol H₂O weiße Kristalle.

Endoxan ist wasserlöslich bei Zimmertemperatur.

pH-Wert der 1 %igen wässrigen Lösung = 4,5.

Ausgangssubstanz in der chemischen Synthesearbeit war das Lost (Senfgas) und das ähnlich wirkende N-Lost. Diese beiden Substanzen haben neben einer lokalen zellschädigenden Wirkung die für die Gruppe der alkylierenden Substanzen kennzeichnenden Effekte.

1.1.2. PHARMAKOLOGIE

Substanzen, die in der Lage sind, Tumorzellen irreversibel zu schädigen, haben erwartungsgemäß auch cytotoxische Wirkung auf Gewebe,

die sich in Proliferation befinden.

Das Bestreben liegt also darin, Substanzen zu entwickeln, deren Verhältnis zwischen cytotoxischer und kurativer Dosis klein gehalten wird. Dieser Anforderung werden Substanzen gerecht, die *in vitro* inaktiv, *in vivo* dagegen wirksam sind. Man hat dies als Transportform-Wirkform-Prinzip bezeichnet. Es hat sich gezeigt, daß Endoxan *in vitro* inaktiv ist, was durch die geringe Dissoziation der Chlorid-Ionen experimentell belegt wurde.

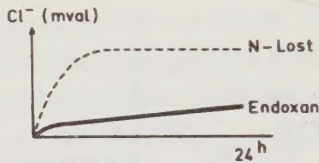
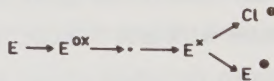


Abb. 1: Dissoziation der Cl^- in vitro

Die biologische Wirksamkeit ist jedoch von der Reaktivität der funktionellen β -chloräthyl-Gruppen abhängig.

Die Aktivierung wird wahrscheinlich durch einen oxydativen Prozeß eingeleitet und erfolgt in mehreren Stufen, wie durch folgendes Schema angedeutet wird:



Da Cyclophosphamid *in vitro* inaktiv ist, *in vivo* dagegen eine starke cytotoxische Wirkung entfaltet (BROCK et al., 1962), ist eine Umwandlung zur Wirkform im Organismus Voraussetzung für den therapeutischen Effekt. BROCK und HOHORST konnten nachweisen, daß Cyclo-

phosphamid durch ein mikrosomales Enzymsystem in der Leber unter Verbrauch von Sauerstoff und reduziertem "NADPH" aktiviert" wird (s. auch FOLEY, FRIEDMANN und DROLET, 1961), und daß dieser Prozeß als mischfunktionelle Oxydation aufzufassen ist.

Die cytostatische Wirkung ist auf die alkylierende Eigenschaft der Carbenium-Ionen (E^+) zu beziehen.

Es ist heute in der Klinik allgemein üblich, Cytostatica in therapeutischen Einheiten (TE) zu dosieren.

DRUCKREY et al. (1962) hatten vorgeschlagen, 1 TE = 1 % der LD_{50} zu setzen. 1 TE entspricht bei der von uns verwandten intraperitonealen Applikation 3 mg/kg Körpergewicht.

RINGLEB und Mitarb. (1968) konnten zeigen, daß schon bei 5 mal 6,6 TE (5 mal 20 mg/kg) Cyclophosphamid, i. p. appliziert, eine 20 %-ige Reduktion des relativen Hodengewichtes erzielt wird. In der Annahme, bei solchen Cyclophosphamid-Wirkungen auf das Hodengewicht könne auch mit spezifischen histochemischen Veränderungen an den Spermatozoen gerechnet werden, wurde die Dosis 5 mal 6,6 TE = 33 TE als Vorschlag für unsere Versuche aufgegriffen.

In Modifikation dieses Vorschlags applizierten wir 3 mal 30 mg/kg, entsprechend 3 mal 10 TE.

Somit stimmt die insgesamt gegebene Menge Cyclophosphamid ungefähr mit der von RINGLEB gewählten Gesamtdosis überein.

1. 2. ALLGEMEINE GESICHTSPUNKTE ZUR CYTOPHOTOMETRIE UND HISTOLOGIE

1. 2. 1. CYTOPHOTOMETRIE

Ziel dieser Methode ist die quantitative Bestimmung der Anfärbbarkeit von "Substanzen" an ihrem Ort, zunächst in relativen Einheiten. Es werden Substanzmengen erfaßt, die in der Größenordnung der innerhalb

der Zellen vorkommenden Mengen liegen. Größenordnung der noch meßbaren Substanzen 10^{-12} - 10^{-14} g/ μ^2 (MEYHÖFER, 1962). Biochemische Analysen liefern Aussagen über größere Zellkollektive; mit der Cytophotometrie hingegen werden Unterschiede zwischen den Einzelzellen bezüglich ihres Gehaltes an bestimmten Substanzen faßbar.

Es liegt nun nahe, Methoden aus der qualitativen Cytochemie zu übernehmen, die mit bestimmten Farbreaktionen entsprechende Substanzen in der Zelle kenntlich machen. Auf diesem Weg wurden beliebig oft reproduzierbare Messungen im technisch günstigeren sichtbaren Spektralbereich möglich. (STOWELL 1945, POLLISTER u. Mitarb. 1946/1947).

1.2.2. HISTOLOGIE

Die in den letzten Jahren gewonnenen exakten Kenntnisse über den Proliferationsmodus u. a. der Maus (Literaturangabe siehe HIELSCHER u. REICHEL, 1968) ermöglichen eine genaue Beurteilung des Samenepithels und seiner Schädigungen.

Im Samenepithel der Maus werden charakteristische Keimzellverbände beschrieben, die sich in einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Verhältnis zueinander befinden. OAKBERG (1956) u. MONESI (1962, 1967) haben diese Keimzellverbände in 12 Stadien geordnet.

Jedes dieser 12 Stadien zeichnet sich durch eine bestimmte Konfiguration der Zelltypen aus (siehe Tabelle 1). Eine Erkennung der entsprechenden Stadien wird außerdem durch charakteristische Veränderungen des Akrosoms und des Zellkerns ermöglicht (OAKBERG, 1956).

Die Spermatogenese beginnt mit der Mitose der A_1 -spg = Spermatogonien im Stadium IX. Durch weitere 6 Mitosen entstehen die A_2 -spg, A_3 -spg, A_4 -spg, die Im-spg, die B-spg und schließlich im Stadium VI die Spermatozyten.

Die Mitosen der proliferierend-regenerierenden Reihe (A_4 , A_1 , A_2 , A_3) findet man in den Stadien IX, XI, I, II, die der differenzierenden Reihe (Im-spg, B-spg) in den Stadien IV und VI.

Im Laufe dieser Entwicklung bewegen sich die Zellen von der untersten Schicht nahe der Tunica propria in die darüber liegende Zellschicht. Sämtliche bei dieser Wanderung durchlaufene Stadien werden als *Cyclus*, die entsprechende Zeit als *Cyclusdauer* bezeichnet. Sie beträgt 8,62 Tage (MONESI, 1967), wobei jedem Stadium ein bestimmter konstanter Zeitraum zuerkannt wird.

Da bei der Maus 4 Keimzellschichten durchlaufen werden, entsprechend einem Zeitraum von 4 *Cyklus*dauern, dauert die Entwicklung der A-spg bis zur Abgabe der reifen Spermatozoen in die Tubuluslichtung $4 \times 8,62 = 34,48$ Tage. Diese genauen Kenntnisse über den Proliferationsmodus des Samenepithels ermöglichen ausführliche Angaben über die Schäden nach Behandlung z. B. mit Cytostatica.

2. FRAGESTELLUNG

Wir wurden durch die Untersuchung von HILSCHER und RINGLEB sowie durch die mikrospektrophotometrischen Arbeiten von CASPERSSON, MEYHÖFER und SANDRITTER, in denen die Leistungsfähigkeit der Mikrospektrophotometrie belegt wurde, angeregt zu untersuchen, welchen Einfluß die Gabe von Cyclophosphamid auf folgende Größen im Spermatozoon von Mäusen hat:

1. Feulgen - Anfärbbarkeit (Feulgen-DNS)
2. Anfärbbarkeit - "Basischer Kernproteine", insbes. Histonproteine
(Fastgreen-Färbung nach ALFERT u. GESCHWIND)
3. Anfärbbarkeit von Arginin
(Sakaguchi-Färbung)
4. Anfärbbarkeit des Gesamtproteins
(Naphthol-Yellow-Färbung)

Neben diesen mikrospektrophotometrischen Messungen interessierte die Frage, inwieweit histologische Veränderungen im Samenepithel dieser Tiere zu sehen sind, ob evtl. auftretende Veränderungen bei unserem Versuch mit den Arbeiten von HILSCHER und Mitarb. zu korrelieren sind und welchen Einfluß die Cyclophosphamid-Applikation auf den Tubulusdurchmesser im Hoden hat.

In Verbindung mit diesen mikroskopischen - anatomischen Ergebnissen sollte das Verhalten der Hodengewichte über die Versuchszeit beurteilt werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. TIERMATERIAL

Es wurden 124 männliche NMRJ-Mäuse aus einem Gruppeninzuchtstamm der Tierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg/Allgäu im Versuch verwendet. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 10 Wochen und 3 Tage alt. Am ersten Tag der Behandlung hatten sie ein durchschnittliches Körpergewicht von 34 g. Die Mäuse wurden in "Makrolonkäfigen" gehalten; jeweils 10 bis 12 Tiere in einem Käfig. Zweimal in der Woche wurde das Einstreu (Hobelspäne) erneuert. Die Tiere erhielten täglich frisches Wasser ad libitum und das Trockenfutter "Altrup". In jeder Woche wurden Käfige und Deckel mit 1 %-iger Trichlorol-Lösung sterilisiert, um Epidemien zu verhindern. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte mit Ohrklipsen in laufender Reihenfolge.

3.2. VERSUCHSPLAN

Der Tierversuch erstreckte sich über die Zeit vom 29. 1. 70 (t_0) bis 11. 4. 70 (t_{12}). Diese Zeitspanne wurde in Intervalle von 8 Tagen unterteilt: $t_0 - t_2 - t_4 - t_6 - t_7 - \dots - t_{12}$

Um zu erwartende Anfangsschwankungen nach Injektion besser erfassen zu können - auch im Hinblick auf die histologische Untersuchung - wurden die Intervalle zwischen t_0 und t_6 noch einmal unterteilt in 4 Tage Abstände: $t_0 - t_1 - t_2 - t_3 - t_4 - t_5 - t_6$

3.3. DOSIERUNG UND APPLIKATIONSFORM

Es erschien uns sinnvoll, Cyclophosphamid dreimal in der Dosis 30 mg pro kg zu applizieren. Gesamtdosis somit 90 mg pro kg. Wir injizierten die einzelnen Cyclophosphamiddosen von dreimal 10 TE im Abstand von 48 Stunden.

Versuchsbeginn und zugleich Tag der ersten Applikation war der 29. 1. 1970.

29. 1. 1970 : 1. Dosis	10 TE = 30 mg/kg
31. 1. 1970 : 2. Dosis	" "
2. 2. 1970 : 3. Dosis	" "

Am Zeitplan für die Entnahme orientiert, erfolgte die erste Applikation zum Zeitpunkt t_0 .

Zum Zeitpunkt t_1 wurde die dritte Injektion verabreicht.

Da die erste Applikation und die erste Entnahme von Hodenmaterial (beide t_0) zusammenfallen, hat der Zeitpunkt t_0 eine Bedeutung für den Ausgangswert, während Meßergebnisse zum Zeitpunkt t_1 bereits schon eventuell vorhandene Cytostaticum-Wirkungen miteinschließen.

Herstellung der Lösung:

Die Auflösung von Cyclophosphamid für Injektionszwecke wurde nach Herstellerempfehlungen in aqua pro injectione vorgenommen. Es wurden jeweils Ampullenflaschen von 200 mg in 10 ml Aqua pro inj. aufgelöst. Diese Stammlösung wurde mit phys. NaCl verdünnt:

$$\frac{200 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} + 90 \text{ ml phys. NaCl}$$

Die so hergestellte Lösung hat eine Konzentration von 200 mg%.

Um eine gewichtsspezifische Dosierung durchführen zu können, wurde

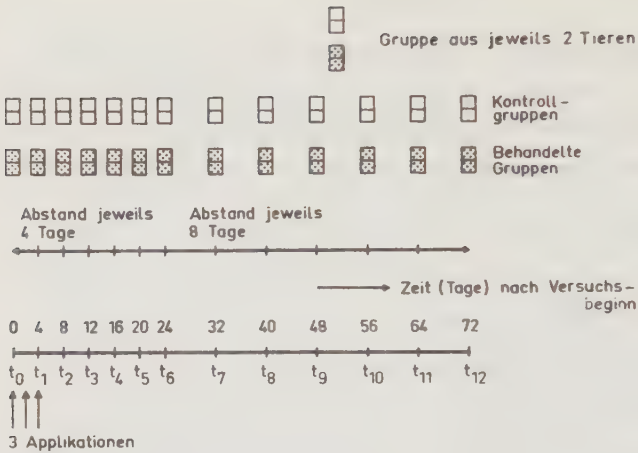


Abb. 2: Versuchsplan

Die Gesamtzahl der Tiere wurde dem Zeitplan folgendermaßen zugeordnet:

Jedem Zeitpunkt (t_x) wurde je eine Gruppe, bestehend aus zwei Tieren mit Cyclophosphamid-Behandlung, und eine Gruppe (zwei Tiere) mit NaCl-Behandlung zugeordnet. Letztere bildeten die Kontrollgruppen. Die Gruppen, die für eine Cyclophosphamid-Behandlung vorgesehen waren, erhielten alle an t_0 ihre erste und jeweils im 48 h-Rhythmus die zweite und dritte Injektion. Jetzt wurden die dem entsprechenden Zeitpunkt zugeordneten Tiere in laufender Reihenfolge getötet (je zwei behandelte und unbehandelte Tiere) und ihre Hoden entnommen. Dem Zeitpunkt t_0 wurde nur eine Gruppe zugeordnet, die als Ausgangswert für die spätere Auswertung angenommen werden konnte.

folgendermaßen umgerechnet:

$$\text{Dosis} = 10 \text{ TE} = 30 \text{ mg/kg} = \frac{3}{100} \text{ mg/g}$$

Ist das Tiergewicht G (in g), so gilt:

$$\text{Dosis} \frac{3}{100} \text{ mg} \times G$$

Dieses Produkt ergibt die zu applizierende Menge Cyclophosphamid in Abhängigkeit vom Tiergewicht.

Weiterhin gilt: V = Menge dividiert durch Konzentration. Aus o. a. Gleichung folgt:

$$\text{Volumen (V)} = \frac{\frac{3}{100} \text{ mg} \times G \text{ (g)}}{\frac{200 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}} = \frac{3}{100} \times \frac{100}{200}$$

$$V = \frac{3}{200} \text{ ml} \times G \text{ (g)}$$

Es wird somit folgende Funktionsgleichung zugrunde gelegt:

$$V = f(G)$$

Das entsprechende Diagramm:

Ordinate = Volumen der Injektionslösung

Abszisse = Tiergewicht

$$\text{Steigung der Geraden (= tan } \alpha) = \frac{3}{200}$$

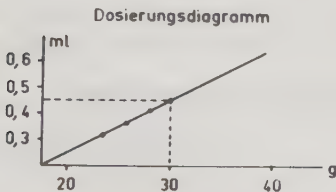


Abb. 3

Dieses Diagramm hat den Vorteil, bei bestimmtem Tiergewicht, das für dieses Tier gewichtsspezifische Volumen und somit bei festgesetzter Konzentration der Injektionslösung die genaue Menge durch einfache lineare Bestimmung zu ermitteln.

Die Injektionen wurden unter sterilen Kautelen intraperitoneal durchgeführt. Um einen peritonealen Kältereiz durch die Lösung zu vermeiden, wurde die Lösung vor der Injektion auf eine "physiologische Temperatur" durch Thermostatregelung im Wasserbad erwärmt (40°C).

Die Injektionen erfolgten stets am Abend, um einen möglichen Einfluß der Tagesperiodik auf die Versuchsergebnisse einzuschränken (ASCHOFF, 1964).

Die Tiere der Kontrollgruppen wurden mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung behandelt wie es der Volumen-Gewicht-Beziehung für die Cyclophosphamid-Lösung entspricht.

3. 4. HISTOLOGIE

3. 4. 1. HERSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

Hier wurden jeweils die kontralateralen Hoden, d. h. die linken Hoden verwendet, da die rechten Hoden durch die Ausstrichtechnik strukturell zerstört wurden.

Fixierung der erhaltenen linken Hoden in MEF-Lösung.

Paraffineinbettung und Herstellung von $5\text{ }\mu$ dicken Schnitten im Mikrotom.

Entparaffinieren und Überführen in 70 %-iges Äthanol.

Anschließend wurde die Färbung vorgenommen:

PAS-Reaktion (periodic-acid-Schiff-reaction),

Prinzip: Polysaccharide (z. B. Glykogen) werden durch Perjodat aufgespalten und zu Aldehyden oxydiert, die mit Schiff's Reagenz einen Farbstoffkomplex bilden.

- a) Die Schnitte werden 5 - 15 Minuten mit Perjodat-Lösung behandelt.
- b) Anschließend folgt gründliches Wässern mit destilliertem Wasser.
- c) Aldehydreaktion mit Schiff's Reagenz 15 - 45 Minuten.
- d) Dreimal 5 Minuten in Sulfittlösung spülen und anschließend wässern.
- e) 10 Minuten gegenfärben mit Mayers Hämalun-Lösung.

3.4.2. AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

Zur Beurteilung gelangten die linken Hoden der gleichen Tiere, die auch cytophotometrisch erfaßt wurden. Hierbei handelt es sich einmal um die mit Cyclophosphamid behandelten Tiere, zum anderen um die mit physiologischer NaCl-Lösung gespritzten Kontrolltiere.

Ausgewertet wurden je zwei behandelte und zwei unbehandelte Tiere. Die Tötungs- bzw. Entnahmetage liegen acht, sechzehn, vierundzwanzig und zweiunddreißig Tage nach der ersten Applikation. Diese Zeitabstände entsprechen der oben erwähnten Cyclisdauer.

Ausgezählt wurden je zwei Tubulusquerschnitte der Stadien V, VII/VIII, X und XII pro Tier. Die mittlere Zellzahl pro Keimzellschicht, z. B. im Stadium XII die Schicht der A_3 -spg, pachytänen Spermatozyten sowie der elongierten Spermatiden werden bei den Kontrolltieren gleich 100 % gesetzt.

Diese Werte werden mit den entsprechenden mittleren Zellzahlen der behandelten Tiere verglichen.

Es gelangten die Tubuli zur Beurteilung, die auch den nachfolgend aufgeführten Kriterien zur Messung der Tubulusdurchmesser entsprachen.

3.4.3. MESSUNG DER TUBULUSDURCHMESSER

Es wurde jeweils der kleinste Durchmesser eines Tubulus gemessen, der vereinbarungsgemäß nicht weniger als 50 % des größten Durchmessers dieses Tubulus sein durfte.

Die Tubulusdurchmesser wurden in den Präparaten gemessen, die auch zur Beurteilung der Spermiogenese verwendet wurden. Jeweils zwei histologische Präparate (von verschiedenen Tieren) bildeten eine Gruppe (s.o.). Es wurden in der gleichen Weise auch Messungen für die oben aufgestellten Kontrollgruppen durchgeführt. Von jedem Präparat wurden 20 Tubuli gemessen, somit pro Gruppe 40 Durchmesser.

Tubulusfaktor 1,25, Vergrößerung 160-fach, hierbei entspricht ein Teilstrich 20,57 μ .

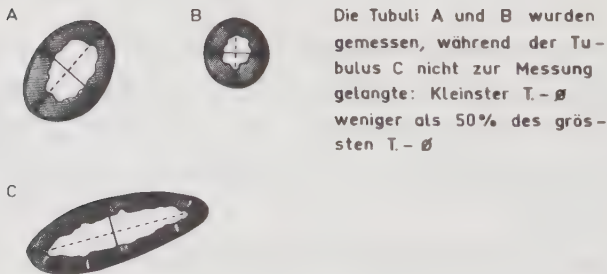


Abb. 4: Beispiele zur Durchführung der Hodentubulimessung

3. 5. MATERIALENTNAHME UND HERSTELLUNG DER AUSSTRICH-PRÄPARATE

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden je zwei mit Cyclophosphamid behandelte und zwei Tiere der entsprechenden Kontrollgruppe mit Aether pro narcosi getötet und nach Eröffnung der Bauchhöhle konnten die Hoden präpariert werden.

Die Hoden wurden unmittelbar nach Präparation auf einer Analysenwaage gewogen.

Als Arbeitsunterlage benutzten wir Filtrierpapier. Die sorgfältig freipräparierten Hoden und Nebenhoden wurden anschließend in eine feuchte Kammer eingebracht.

Danach wurden die Hoden (ohne Nebenhoden) mit einer Analysenwaage gewogen (s. Gewichtstabellen).

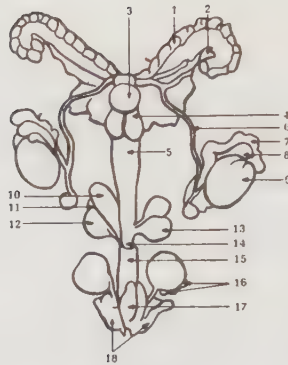


Abbildung: Übersichtsdarstellung der männlichen Genitalien der Maus (nach HAGEMANN und SCHMID, 1960)

1 Vesikulardrüse, 2 Koagulationsdrüse, 3 Blase, 4 Ventrale Prostata, 5 Urethra membranosa, 6 Ductus deferens, 7 Fettkörper, 8 Epididymis, 9 Hoden, 10 Musculus ischiocavernosus, 11 Bulbourethraldrüse, 12 M. bulbocavernosus, 13 Urethraldivertikulum, 14 Corpus cavernosum penis, 15 Corpus cavernosum urethrae, 16 Präputialdrüse, 17 Penis, 18 Präputium.

Herstellung der Ausstrichpräparate:

Die Ausstrichpräparate wurden jeweils vom rechten Hoden und Nebenhoden des Tieres angefertigt.

Der Hoden wurde mit einer scharfen Rasierklinge in der Mitte quer durchtrennt. Die beiden Teile wurden mit einer anatomischen Pinzette gefaßt und mit der Schnittfläche auf den Objektträger (Material : "reinweiß" - 7,6 x 2,6 mm) aufgesetzt und unter leichtem Druck der Pinzette wurde der Inhalt ausgestrichen.

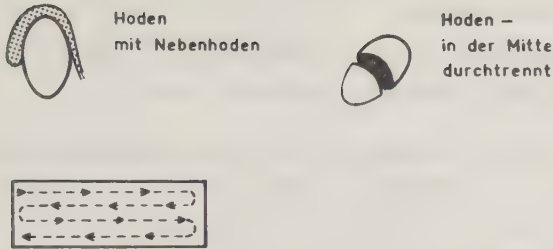


Abb. 6: Präparations - und Ausstrichtechnik

So entstanden vier "Streifen" größtenteils flüssigen Hodeninhaltes.

Mit dem Nebenhoden wurde folgendermaßen verfahren:

Mit der Rasierklinge wurde der Nebenhodenkopf abgetrennt, ebenso wurde der Stumpf des Ductus deferens abpräpariert. Es wurde ausschließlich der Nebenhodenkopf (NHK) für den Ausstrich verwendet.

Beim Hodenausstrich gelangten neben freien Spermatozoen auch Spermiogenesezellen und Zellen des Zwischengewebes auf den Objektträger, die jedoch bei der späteren Messung der Spermatozoen keine Berücksichtigung fanden.

Der Nebenhodenausstrich war größtenteils frei von anderen Gewebs-elementen, wie die Kontrolle unter dem Lichtmikroskop ergab. Auf diese Weise wurden von jedem Hoden- und Nebenhodenpräparat, entsprechend den vorgesehenen Färbungen, je vier Ausstrichpräparate hergestellt.

Unmittelbar nach dem Ausstreichen wurden die Objektträger nach Kennzeichnung in die Fixierlösung eingebracht.

Zur Fixation diene die sogenannte MEF-Lösung:

= Methylalkohol	85 Vol %
Eisessig	5 Vol %
10 %-iges Formalin	10 Vol %

Dauer der Fixierung 20 Minuten. Die Fixierlösung wurde stets frisch zubereitet.

3. 6. FÄRBETECHNIKEN

3. 6. 1. NUKLEALFÄRBUNG NACH FEULGEN

Prinzip: Durch Hydrolyse werden aus der Thymonukleinsäure die Purinkörper Guanin und Adenin abgespalten. Der verbleibende Rest (Thyminsäure) bleibt (an das Eiweiß als Substrat gebunden) im Zellkern zurück.

Seine freien Aldehydgruppen verbinden sich mit der fuchsin-schwefligen Säure (Schiff'sches Reagenz) zu einem rot-violetten Farbton.

Ausführung:

- 12 Minuten Hydrolyse in 1 n HCl bei 60°C.
- Abbrechen der Hydrolyse durch Einbringen in H₂O.
- Zwei Stunden in Schiff'sches Reagenz.
- Dreimaliges Auswaschen, jeweils zwei Minuten in frischem SO₂-Wasser.
- Auswaschen in fließendem Wasser für 5 - 10 Minuten.

3.6.2. DIE FASTGREEN-FÄRBUNG

nach ALFERT und GESCHWIND

Prinzip: Mit dieser Färbung werden basische Kern-Proteine, insbesondere Histonproteine erfaßt.

Ausführung:

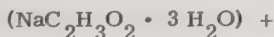
- a) Die zur Färbung vorbereiteten Ausstriche wurden 15 Minuten lang in 5 %-iger Trichloressigsäure (TCS)-Lösung (5 g TCS-Kristalle in 95 ml H_2O) behandelt. Diese Lösung ist im kochenden H_2O -Bad auf $95^{\circ}C$ gebracht worden und behielt diese Temperatur während der 15 Minuten konstant.
- b) Anschließend wurden die Präparate 3 mal in 70 %-igem Alkohol je 10 Minuten gewaschen und dazwischen jeweils in Aqua dest. gespült.
- c) 30 Minuten Färbung in 0,1 %-iger wässriger Fastgreen-Lösung bei pH 8,2 (mit Michaelispuffer hergestellt).
- d) Anschließend 5 Minuten auswaschen in Michaelispuffer.
- e) 3 Minuten in 96 %-igem Alkohol behandeln.

Herstellung der 0,1 %-igen wässrigen Fastgreen-Lösung:

100 mg Fastgreen (FCF) National-Anilin-Dir. (96 % dye content-Allied Chemical) wurden in 100 ml Puffer (pH 8,2) gelöst.

Michaelispuffer von GEIGY:

Stammlösung A: 19,43 Na-Acetat



29,43 g Veronalnatrium in 1000 ml Aqua dest. lösen.

Stammlösung B: 0,1 n HCl (1 ml 1 n HCl + 9 ml H_2O)

Stammlösung C: 8,5 % NaCl (34 ml 10 %-ige NaCl + 6 ml Aqua dest.)

pH 8,2: 50 ml Stammlösung A + 22 ml Stammlösung B + 20 ml Stammlösung C werden mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.

3.6.3. DIE SAKAGUCHI-FÄRBUNG

Prinzip: Reaktion zum Nachweis von Arginin.

Ausführung:

- a) Kurze Eingabe in aqua dest., abtrocknen.
- b) 10 Minuten Lagerung in einer Mischung aus 4 %-iger Bariumhydroxid-, 1 %-iger Natriumhypochlorid- und 1,5 %-iger 2,4 Dichloro- α -Naphthol-Lösung.
- c) Dreimaliges Spülen in 5 %-igem Tri-n-Butylamin in tertiärem Butanol (5, 30, 30 Sek.)
- d) Zweimal 30 Sek. in 5 %-igem Tri-n-Butylamin in Xylol spülen.

3.6.4. DIE NAPHTHOL-YELLOW-FÄRBUNG

Prinzip: Erfast das Gesamteiweiß der Zelle.

Ausführung:

- a) Die Schnitte werden bei Zimmertemperatur 15 Minuten in Reagenz A (1 g Naphthol-Yellow 5 + 100 ml 1 %-ige Essigsäure - pH 2,72) gelegt.
- b) Anschließend für ganz kurze Zeit in 1 %-ige Essigsäure überführen. (Danach sofort wieder herausnehmen). Nachfolgend in Aqua dest. In der Differenzierungslösung muß eine schwach gelbliche Färbung zum Vorschein kommen.
- c) Schnitte in Butanol entwässern.

3. 7. DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN

Prinzip:

Monochromatisches Licht fällt auf das Objekt (z. B. Einzelzelle-Spermatozoon), das mit einem üblichen Mikroskop betrachtet wird. Die Objektstelle wird ausgeblendet und die Intensität des durchfallenden Lichtes (Extinktion) wird photoelektrisch registriert. Dabei wird das Objekt - Spermatozoon - gegenüber seiner Umgebung beurteilt:

Relative Extinktion des Objekts als Differenz zwischen Gesamtextinktion - Objekt und Untergrund - und dem Leerfeld. Im Leerfeld sollen sich keine anderen korpuskulären Elemente befinden.

Für die cytophotometrischen Messungen standen zwei Geräte zur Verfügung:

Integrierendes Mikrodensiometer nach DEELEY (1955)

Gerät I: integrating microdensiometer

Type G, N, 2 N^O 46

Mit diesem Gerät wurden die Färbungen "FEULGEN" und "Naphthol-Yellow" gemessen.

Gerät II: integrating microdensiometer

Type G, N, 2 N^O 79

Mit diesem Gerät wurden die Färbungen "Fastgreen" und "SAKAGUCHI" gemessen.

Es gelten folgende Absorptionsmaxima für die einzelnen Färbungen:

FEULGEN	570 nm
SAKAGUCHI	510 nm
Fastgreen	635 nm
Naphthol-Yellow	435 nm

Da die gefärbten Ausstrichpräparate mit dem optisch indifferenten EUKITT eingedeckt und unter Lichtausschluß aufbewahrt wurden, gab es bei der Messung keine diesbezüglichen Störgrößen.

In den gefärbten Präparaten ließen sich die als reif anzusehenden Spermatozoen deutlich von den übrigen zellulären Elementen im Ausstrichpräparat differenzieren. Es gelangten grundsätzlich alle Spermatozoen zur Messung, die folgende morphologischen Kriterien aufzuweisen hatten,



Abb. 7: Formen reifer Spermatozoenköpfe

Es wurde grundsätzlich in Bereichen gemessen, die nicht weniger als 3 mm vom Objektträgerrand entfernt waren.

Von jedem Tier wurden in vier Färbungen jeweils 100 Spermatozoen von einem Hoden- und einem Nebenhoden-Präparat gemessen.

Somit ergab sich für die zytophotometrische Auswertung für eine Färbung eine Gesamtzahl von 10.000 zu messenden Zellen, also insgesamt 40.000 Zellen. (Anzahl der Einzelwerte = n).

3.8. STATISTIK

Varianzanalyse:

In der vorliegenden Versuchsanordnung bestimmen vier Faktoren die Mittelwerte:

1. Tiere
2. Behandlung (behandelt/unbehandelt)
3. Zeiten (t_x)
4. Hoden/Nebenhoden

Zum Vergleich der Mittelwerte eignete sich eine Erweiterung des Partiell-Hierarchischen-Modells der Varianzanalyse.

Die Mittelwerte wurden aus jeweils 100 Einzelwerten eines jeden Präparates berechnet.

Die Varianzanalyse beruht auf einer rein arithmetischen Zerlegung der Quadratsumme (= Summe der Abweichungsquadrate der Stichprobenwerte vom Mittelwert). Man zerlegt in eine Summe von Bestandteilen, deren jede einer bestimmten Variationsursache entspricht.

Mit Hilfe des F-Testes wird geprüft, ob eine Variationsursache einen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse hat.

χ^2 -Test:

Um die Ergebnisse der Histologie statistisch zu sichern, wird der sogenannte χ^2 -Test durchgeführt. Verglichen werden die Zellzahlen gleicher Stadien von behandelten und unbehandelten Tieren. Als dritte Größe bzw. Bezugsgröße dient hierbei der erwartete Wert, der sich als Mittelwert der beiden erwähnten Werte darstellt.

$$\chi^2 = \frac{\text{Summe der Abweichungsquadrate}}{\text{Mittelwert}} = \frac{S (x-m)^2}{m}$$

t-Test:

Die nach Messung der Tubulusdurchmesser und Hodengewichte gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des t-Testes (Vergleich zweier Mittelwerte) auf signifikante Unterschiede überprüft.

3.9. IN DEN TABELLEN UND DARSTELLUNGEN VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

In den nachfolgenden Tabellen und den zugehörigen graphischen Darstellungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

t_0 =	Versuchsbeginn	t_7 =	32 Tage
t_1 =	4 Tage	t_8 =	40 Tage
t_2 =	8 Tage	t_9 =	48 Tage
t_3 =	12 Tage	t_{10} =	56 Tage
t_4 =	16 Tage	t_{11} =	64 Tage
t_5 =	20 Tage	t_{12} =	72 Tage
t_6 =	24 Tage		

n = Anzahl der gemessenen Einzelwerte

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel aus n Meßwerten, angegeben in Arbeitseinheiten (AE)

Behandelte Gruppen:

$\bar{x}_A, \bar{x}_B$ = Mittelwerte von 100 Spermatozoen

$\bar{x}_{200}$ = Mittelwerte von 200 Spermatozoen aus $\bar{x}_A$ und $\bar{x}_B$.

Unbehandelte Gruppen:

$\bar{x}_C, \bar{x}_D$ = Mittelwerte von 100 Spermatozoen

$\bar{x}_{200}$ = Mittelwerte von 200 Spermatozoen aus $\bar{x}_C$ und $\bar{x}_D$.

$\bar{x}_{400}$ = Mittelwerte aus 400 Spermatozoen

(Behandelte und unbehandelte Gruppen zusammengefaßt).

$$= \frac{\bar{x}_A + \bar{x}_B}{2} + \frac{\bar{x}_C + \bar{x}_D}{2}$$

Abkürzungen bei den varianzanalytischen Tabellen:

Unter Verwendung folgender Indices werden in der Varianzanalyse verglichen:

A	: Hoden mit Nebenhoden
B(C, D)	: Tiere untereinander (unter Konstanthaltung von Zeit und Behandlung)
C	: die einzelnen Versuchstage miteinander
D	: behandelte mit unbehandelten Tieren.

Mitosen der proliferierend-regenerierenden Reihe:

$$MA_1 = A_1\text{-spg} \quad \text{zu} \quad A_2\text{-spg} + A_2\text{-spg}$$

$$MA_2 = A_2\text{-spg} \quad \text{zu} \quad A_3\text{-spg} + A_3\text{-spg}$$

$$MA_3 = A_3\text{-spg} \quad \text{zu} \quad A_4\text{-spg} + A_4\text{-spg}$$

Mitosen der differenzierenden Reihe:

$$MIm = Im\text{-spg} \quad B\text{-spg} + B\text{-spg}$$

$$MB = B\text{-spg} \quad R\text{-Spermatozyte} + R\text{-Spermatozyte}$$

(spg = Spermatogonien)

4. ERGEBNISSE

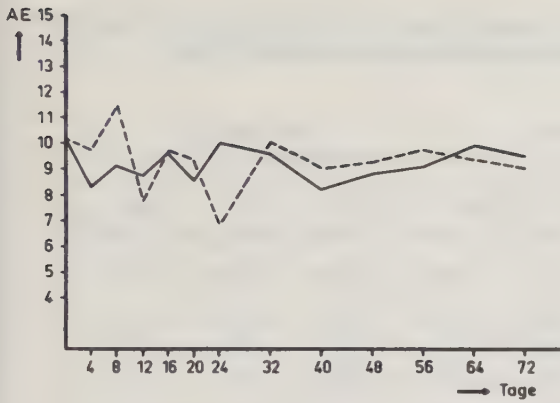
4.1. MESSERGEBNISSE DER CYTOPHOTOMETRIE

Tab. 2: Mittelwerte (in AE) der Feulgen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden behandelter und unbehandelter Tiere

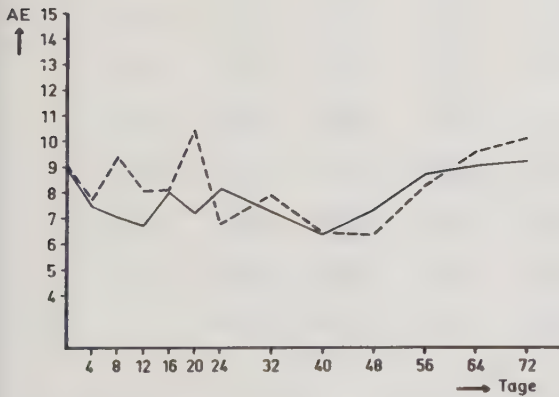
Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	9,59	10,74	10,16	9,59	10,74	10,16
4	8,01	8,64	8,32	8,67	10,75	9,71
8	10,74	7,53	9,13	11,38	11,62	10,50
12	9,73	7,80	8,76	8,20	7,29	7,74
16	10,17	9,07	9,62	9,29	10,23	9,76
20	7,86	9,39	8,62	9,40	9,36	9,38
24	8,89	11,16	10,02	7,23	6,53	6,88
32	10,35	8,92	9,63	10,23	10,09	10,16
40	8,80	7,71	8,25	9,18	9,01	9,09
48	8,87	8,95	8,86	10,44	8,26	9,35
56	9,44	8,89	9,16	8,36	11,31	9,83
64	10,90	9,10	10,00	8,30	10,57	9,43
72	9,21	10,00	9,60	8,53	9,70	9,11

Tab. 3: Mittelwerte (in AE) der Feulgen-Anfärbbbarkeit der Spermatozoen in Nebenhoden behandelter und unbehandelter Tiere

Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	8,46	9,74	9,10	8,46	9,74	9,10
4	7,22	7,69	7,45	7,78	7,64	7,71
8	7,08	7,03	7,05	8,06	10,79	9,42
12	7,23	6,32	6,77	8,36	7,76	8,06
16	8,59	7,40	7,99	8,59	7,66	8,12
20	6,84	7,53	7,18	11,47	9,44	10,45
24	8,45	7,92	8,18	6,96	6,65	6,80
32	6,63	7,88	7,25	7,27	8,62	7,94
40	6,68	6,23	6,45	6,61	6,32	6,46
48	8,15	6,64	7,39	6,37	6,40	6,38
56	9,13	8,42	8,77	8,59	7,99	8,27
64	8,97	9,13	9,05	7,60	11,61	9,60
72	10,05	8,45	9,25	10,05	10,10	10,07



Darstellung 1: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FEULGEN-Anfärbbarkeit von Hoden-Spermatozoen behandelte (—) und unbehandelte (---) Tiere.



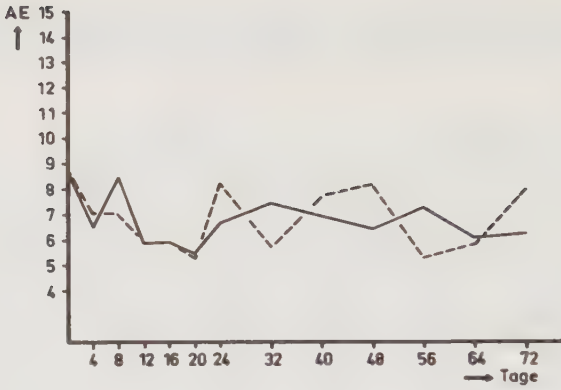
Darstellung 2: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FEULGEN-Anfärbbarkeit von Nebenhoden-Spermatozoen behandelte (—) und unbehandelte (---) Tiere

Tab. 4: Mittelwerte (in AE) der Fastgreen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden behandelter und unbehandelter Tiere

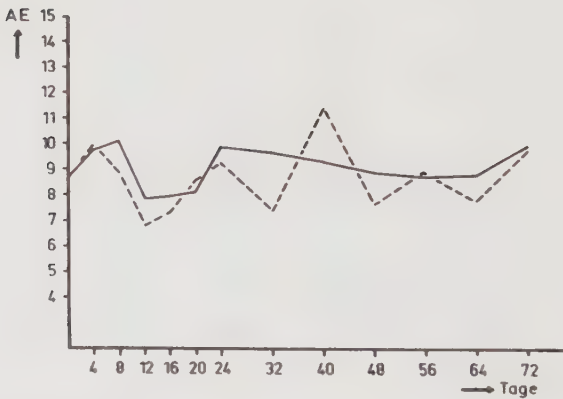
Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	7,78	9,68	8,73	7,78	9,68	8,73
4	6,81	6,33	6,57	6,75	7,48	7,11
8	8,31	8,67	8,49	6,87	7,13	7,00
12	5,63	6,17	5,90	5,76	6,14	5,95
16	6,18	5,62	5,90	5,83	6,01	5,92
20	5,00	5,97	5,48	4,87	5,77	5,32
24	5,23	8,08	6,65	8,08	8,43	8,25
32	8,01	6,86	7,43	5,07	6,40	5,73
40	6,59	7,28	6,93	7,68	7,75	7,71
48	5,25	7,62	6,43	7,87	8,44	8,15
56	7,78	6,75	7,26	5,24	5,33	5,28
64	6,59	5,54	6,06	5,48	5,97	5,82
72	6,67	6,81	6,24	7,89	8,06	7,97

Tab. 5: Mittelwerte (in AE) der Fastgreen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Nebenhoden behandelter und unbehandelter Tiere

Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	8,89	9,92	9,40	8,89	9,92	9,40
4	9,44	10,07	9,75	9,01	10,86	9,93
8	10,81	9,38	10,10	8,94	8,79	8,86
12	7,80	7,91	7,85	5,82	7,78	6,80
16	8,21	7,73	7,97	7,18	7,43	7,30
20	7,80	8,44	8,12	8,34	8,81	8,57
24	9,68	10,05	9,87	8,11	10,39	9,25
32	9,35	9,97	9,66	6,74	8,07	7,40
40	9,82	8,80	9,31	10,65	12,23	11,44
48	7,94	9,86	8,90	8,43	6,85	7,64
56	8,21	9,33	8,77	7,74	10,06	8,90
64	8,76	8,95	8,80	7,74	7,83	7,78
72	9,82	10,08	9,95	9,69	9,75	9,72



Darstellung 3: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FASTGREEN-Anfärbbarkeit von Hoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere.



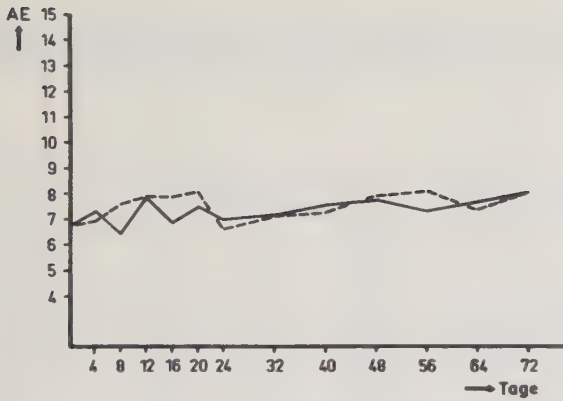
Darstellung 4: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FASTGREEN-Anfärbbarkeit von Nebenhoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere

Tab. 6: Mittelwerte (in AE) der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden behandelter und unbehandelter Tiere

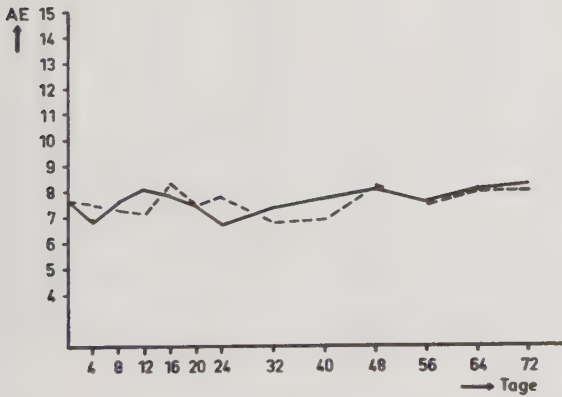
Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	6,75	6,82	6,78	6,75	6,82	6,78
4	7,38	7,29	7,33	6,81	7,18	7,00
8	6,24	6,75	6,49	8,34	7,05	7,69
12	8,05	7,89	7,97	7,41	8,54	7,97
16	6,50	7,47	6,98	7,69	8,14	7,91
20	7,38	7,72	7,55	7,87	8,44	8,15
24	6,85	7,26	7,05	7,22	6,14	6,68
32	7,32	7,11	7,21	7,29	7,11	7,20
40	7,91	7,41	7,66	7,39	7,23	7,31
48	7,38	8,28	7,83	8,37	7,66	8,00
56	7,53	7,40	7,46	7,88	8,53	8,20
64	7,81	7,73	7,77	7,20	7,83	7,50
72	8,36	8,00	8,18	8,33	8,08	8,20

Tab. 7: Mittelwerte (in AE) der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Nebenhoden behandelter und unbehandelter Tiere

Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	7,71	7,66	7,69	7,71	7,66	7,69
4	7,63	5,99	6,81	7,70	7,31	7,50
8	8,34	6,89	7,62	7,32	7,28	7,30
12	9,42	6,79	8,10	6,84	7,51	7,18
16	7,96	7,70	7,83	8,38	8,32	8,35
20	7,75	7,13	7,44	6,87	8,15	7,50
24	6,54	7,04	6,79	7,29	7,41	7,85
32	7,32	7,59	7,41	6,54	7,09	6,81
40	8,40	7,18	7,79	7,17	6,78	6,97
48	8,07	8,34	8,20	8,06	8,40	8,23
56	7,69	7,58	7,63	7,75	7,36	7,55
64	8,06	8,14	8,10	8,12	7,99	8,05
72	8,02	8,52	8,27	8,52	7,95	8,08



Darstellung 5: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der SAKAGUCHI-Anfärbbarkeit von Hoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere.



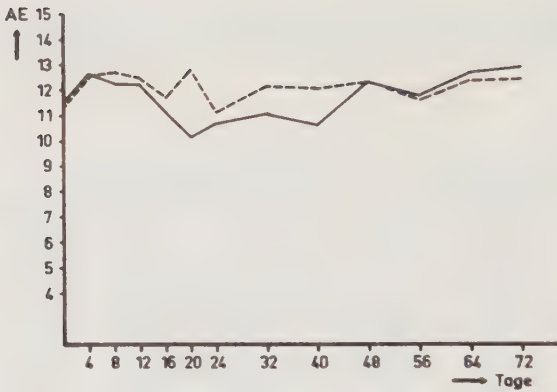
Darstellung 6: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der SAKAGUCHI-Anfärbbarkeit von Nebenhoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere.

Tab. 8: Mittelwerte (in AE) der Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden behandelter und unbehandelter Tiere

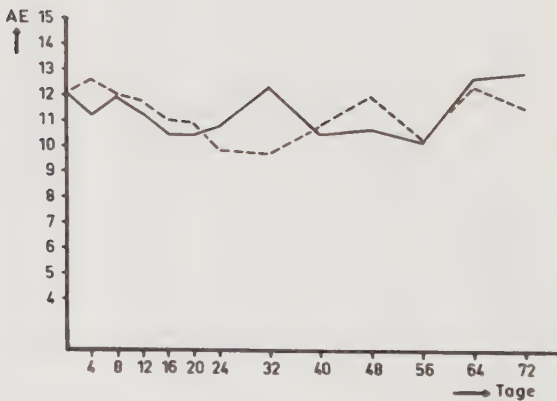
Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	12,09	10,77	11,43	12,09	10,77	11,43
4	12,83	12,43	12,63	13,18	11,96	12,57
8	12,47	12,08	12,27	12,73	12,66	12,69
12	12,08	12,33	12,20	12,69	12,23	12,46
16	11,32	10,91	11,11	11,21	12,19	11,70
20	9,91	10,37	10,14	12,25	13,23	12,74
24	9,37	12,02	10,69	10,97	11,23	11,10
32	11,01	11,09	11,05	12,21	12,02	12,11
40	10,63	10,69	10,66	12,26	11,75	12,00
48	12,07	12,44	12,25	12,72	11,83	12,27
56	11,80	11,69	11,74	12,42	10,69	11,55
64	13,01	12,27	12,64	11,96	12,70	12,33
72	13,28	12,41	12,84	12,13	12,61	12,37

Tab. 9: Mittelwerte (in AE) der Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Nebenhoden behandelter und unbehandelter Tiere

Tage	Behandelt			Unbehandelt		
	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_B$	$\bar{x}_{200}$	$\bar{x}_C$	$\bar{x}_D$	$\bar{x}_{200}$
0	12,54	11,63	12,08	12,54	11,63	12,08
4	12,28	10,03	11,15	11,84	13,35	12,59
8	11,52	12,24	11,88	10,98	13,03	12,00
12	11,11	11,39	11,25	11,70	11,83	11,76
16	11,18	9,74	10,46	10,99	11,02	11,00
20	10,10	10,73	10,41	10,79	10,97	10,88
24	11,43	10,05	10,74	9,22	11,44	9,83
32	11,25	13,33	12,29	9,40	10,00	9,70
40	11,48	9,45	10,46	11,12	10,40	10,76
48	10,66	10,57	10,61	11,51	12,31	11,91
56	9,86	10,55	10,20	10,44	8,98	10,21
64	14,26	11,00	12,63	12,27	12,28	12,27
72	13,65	12,08	12,86	11,90	10,98	11,44



Darstellung 7: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der NAPHTHOL-YELLOW-Anfärbbarkeit von Hoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere.



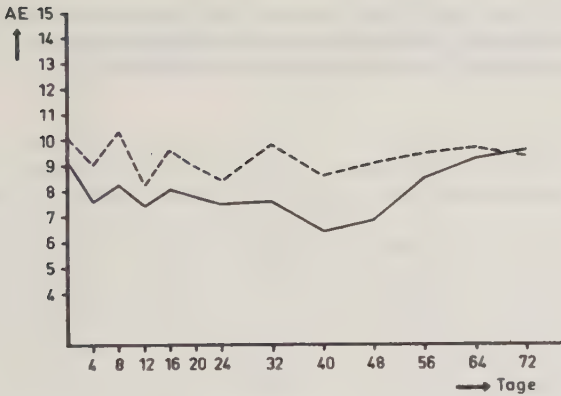
Darstellung 8: Vergleichende Darstellung der aus 200 Zellen gewonnenen Mittelwerte der NAPHTHOL-YELLOW-Anfärbbarkeit von Nebenhoden-Spermatozoen behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere

Tab. 10: Mittelwerte (in AE) der Feulgen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden und Nebenhoden. Behandelte und unbehandelte Gruppen sind zusammengefaßt.

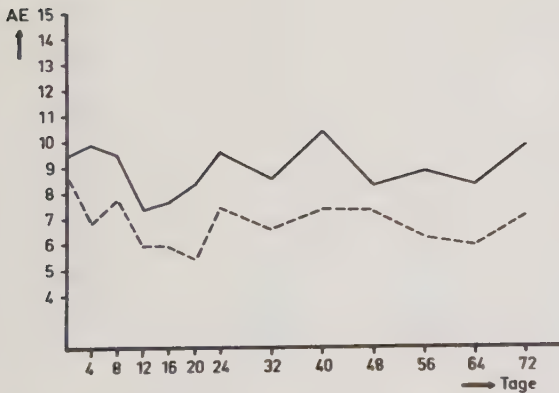
	Hoden	Nebenhoden
Tage	$\bar{x}_{400}$	$\bar{x}_{400}$
0	10,16	9,10
4	9,01	7,58
8	10,31	8,24
12	8,25	7,41
16	9,69	8,06
20	9,00	8,82
24	8,45	7,49
32	9,89	7,60
40	8,67	6,46
48	9,10	6,89
56	9,50	8,53
64	9,71	9,32
72	9,36	9,66

Tab. 11: Mittelwerte (in AE) der Fastgreen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden und Nebenhoden. Behandelte und unbehandelte Gruppen sind zusammengefaßt

	Hoden	Nebenhoden
Tage	$\bar{x}_{400}$	$\bar{x}_{400}$
0	8,73	9,40
4	6,84	9,84
8	7,74	9,48
12	5,92	7,32
16	5,91	7,63
20	5,40	8,34
24	7,45	9,56
32	6,58	8,53
40	7,32	10,37
48	7,29	8,27
56	6,27	8,83
64	5,94	8,29
72	7,10	9,83



Darstellung 9: Vergleichende Darstellung der aus 400 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FEULGEN-Anfärbbarkeit von Hoden (---)- und Nebenhoden (—)-Spermatozoen.



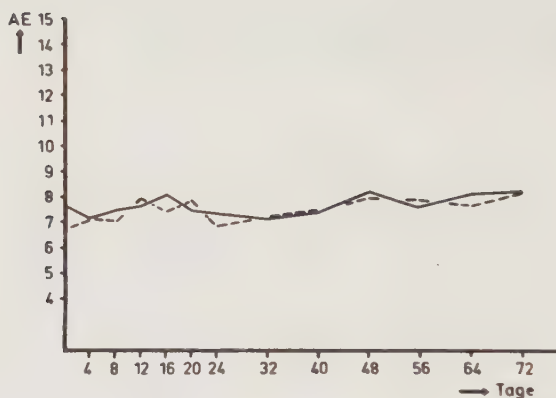
Darstellung 10: Vergleichende Darstellung der aus 400 Zellen gewonnenen Mittelwerte der FASTGREEN-Anfärbbarkeit von Hoden (---)- und Nebenhoden (—)-Spermatozoen.

Tab. 12: Mittelwerte (in AE) der Sakaguchi-Anfärbbbarkeit der Spermatozoen in Hoden und Nebenhoden. Behandelte und unbehandelte Gruppen sind zusammengefaßt

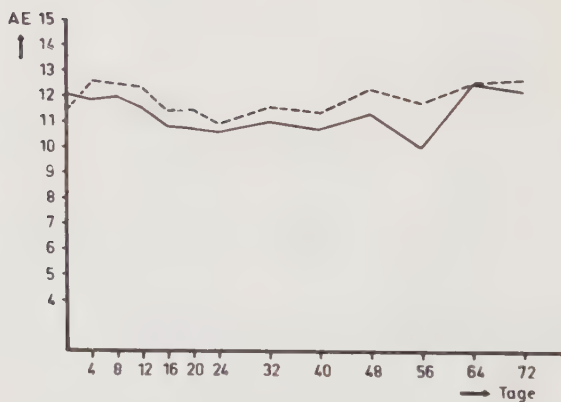
	Hoden	Nebenhoden
Tage	$\bar{x}_{400}$	$\bar{x}_{400}$
0	6,78	7,69
4	7,16	7,15
8	7,09	7,46
12	7,97	7,64
16	7,44	8,09
20	7,85	7,47
24	6,86	7,32
32	7,20	7,11
40	7,48	7,38
48	7,91	8,21
56	7,83	7,59
64	7,63	8,07
72	8,19	8,17

Tab. 13: Mittelwerte der Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit der Spermatozoen in Hoden und Nebenhoden. Behandelte und unbehandelte Gruppen sind zusammengefaßt

Tage	Hoden	Nebenhoden
	$\bar{x}_{400}$	$\bar{x}_{400}$
0	11,43	12,08
4	12,60	11,87
8	12,48	11,94
12	12,33	11,50
16	11,40	10,73
20	11,44	10,64
24	10,89	10,53
32	11,58	10,99
40	11,33	10,61
48	12,26	11,26
56	11,65	9,95
64	12,48	12,45
72	12,60	12,15



Darstellung 11 : Vergleichende Darstellung der aus 400 Zellen gewonnenen Mittelwerte der SAKAGUCHI-Anfärbbarkeit von Hoden (---) - und Nebenhoden (—) - Spermatozoen.



Darstellung 12 : Vergleichende Darstellung der aus 400 Zellen gewonnenen Mittelwerte der NAPHTHOL-YELLOW-Anfärbbarkeit von Hoden (---) - und Nebenhoden (—) - Spermatozoen

4.2. VARIANZANALYTISCHE TABELLEN DER STATISTISCH AUSGEWERTETEN ERGEBNISSE DER CYTOPHOTOMETRIE

Tab. 14: Feulgen-Färbung
Ergebnisse der Varianzanalyse

Index	SAQ	f	MAQ	F-Wert
AB(C, D)	20,6258	26	0,7933	-
ACD	10,8556	12	0,9046	1,1403
AC	16,9522	12	1,4127	1,7807
AD	0,8015	1	0,8015	1,0103
A	39,2248	1	39,2248	49,4451 **
B(C, D)	31,7342	26	1,2205	-
CD	29,5164	12	2,4597	2,0153
C	47,4077	12	3,9506	3,2368 **
D	2,7560	1	2,7560	2,2580

** = signifikante Änderung bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "

Tab. 15: Fastgreen-Färbung
Ergebnisse der Varianzanalyse

Index	SAQ	f	MAQ	F-Wert
AB(C, D)	11,1788	26	0,4299	-
ACD	11,3859	12	0,9488	2,2070 [*]
AC	13,9259	12	1,1605	2,6994 [*]
AD	1,2761	1	1,2761	2,9683
A	112,3616	1	112,3616	261,3668 ^{**}
B(C, D)	22,6604	26	0,8715	-
CD	19,5294	12	1,6274	1,8673
C	69,0083	12	5,7507	6,5986 ^{**}
D	1,0440	1	1,0440	1,1979

** = signifikante Änderung bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "

Tab. 16: Sakaguchi-Färbung
Ergebnisse der Varianzanalyse

Index	SAQ	f	MAQ	F-Wert
AB(C, D)	6,1638	26	0,2370	-
ACD	3,0149	12	0,2512	1,0599
AC	3,5384	12	0,2949	1,2443
AD	0,4188	1	0,4188	1,7670
A	0,4658	1	0,4658	1,9654
B(C, D)	7,1373	26	0,2745	-
CD	3,2517	12	0,2710	0,9872
C	14,3911	12	1,1993	4,3690 ^{**}
D	0,0765	1	0,0765	0,2786

** = signifikante Änderung bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "

Tab. 17: Naphthol-Yellow-Färbung
Ergebnisse der Varianzanalyse

Index	SAQ	f	MAQ	F-Wert
AB(C, D)	15,5380	26	0,5976	-
ACD	10,8519	12	0,9043	1,5132
AC	6,9135	12	0,5761	0,9640
AD	1,5048	1	1,5048	2,5180
A	9,2583	1	9,2583	15,4924 ^{**}
B(C, D)	19,9368	26	0,7668	-
CD	11,3790	12	0,9482	1,2365
C	38,3532	12	3,1961	4,1681 ^{**}
D	0,9867	1	0,9867	1,2867

^{**} = signifikante Änderung bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "

4. 3. AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

4. 3. 1. BEURTEILUNG DER SPERMIOGENESEZELLEN

Tabelle 18: Mittelwerte der Anzahl der Spermio-genese-Zelltypen aus jeweils 4 Hodentubuli in den Stadien V, VII/VIII, X und XII behandelter und unbehandelter Tiere 8 Tage nach Versuchsbeginn

	Stadium V		Stadium VII/VIII		Stadium X		Stadium XII	
	U	B	U	B	U	B	U	B
A ₁	1,5	1,5 = 100%	1,75	1,75 = 100%				
A ₂					2,25	1,75 = 78%		
A ₃							5,25	3,00 = 57%
B	21,75	11,0 = 51%						
R			40	26,25 = 66%				
L					41,25	5,25 = 13%	40	23,25 = 58%
Z								
P	31,50	33,75 = 105%	40,25	41,75 = 103%	47	46,00 = 98%	63,75	73,50 = 100%
Sp I	102,75	111,25 = 108%	109,25	131,25 = 120%				
Sp II	116	113,75 = 98%	91,75	74,75 = 81%	93,25	112,75 = 120%	100,75	101,00 = 100%

** signifikanter Unterschied bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

* " " " 5%

Tabelle 19: Mittelwerte der Anzahl der Spermiogenese-Zelltypen aus jeweils 4 Hodentubuli in den Stadien V, VII/VIII, X und XII behandelter und unbehandelter Tiere 16 Tage nach Versuchsbeginn

	Stadium V			Stadium VII/VIII			Stadium X			Stadium XII		
	U	B		U	B		U	B		U	B	
A ₁	1,75	1,75=100%		2	1,5 = 75%							
A ₂							2,25	1,5 = 67%				
A ₃										5,25	2,25= 43%	
B	19,75	21,25=107%										
R				44,75	34,00= 76%							
L							44,5	31,00= 70%				
Z												
P	50,75	3,5 = 7%	**	51	4 = 8%	**	53,5	3 = 6%	**	49	45,20= 92%	
Sp I	133,25	105,75= 79%		127,25	105,25= 83%					64,75	2,25= 3%	
Sp II	106,75	98,75= 92%		104,75	98,75= 90%		100	102 =102%		103	103,25=100%	

** signifikanter Unterschied bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

* " " " 5%

Tabelle 20: Mittelwerte der Anzahl der Spermiogenese-Zelltypen aus jeweils 4 Hodentubuli in den Stadien V, VII/VIII, X und XII behandelter und unbehandelter Tiere 24 Tage nach Versuchsbeginn

	Stadium V		Stadium VII/VIII		Stadium X		Stadium XII	
	U	B	U	B	U	B	U	B
A ₁	1,75	1,25 = 71%	1,75	1,5 = 86%				
A ₂					1,75	1,5 = 86%		
A ₃							5,0	2,0 = 40%
B	31	26 = 84%						
R			38,75	38,5 = 99%				
L					40,25	46,5=116%		
Z							40	36 = 90%
P	38,5	31,75 = 82%	37,75	58,75=106%	44,75	45,0=101%	44,25	47 = 106%
Sp I	102,25	8,5 = 8% **	97,0	2,75 = 3% **				
Sp II	102	104,25=102%	97,75	76 = 78%	133	6,75 = 5% **	104,5	7 = 6% **

** signifikanter Unterschied bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

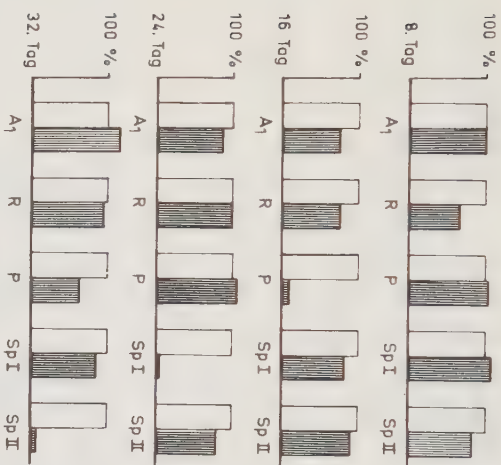
* " " " 5% %

Tabelle 21: Mittelwerte der Anzahl der Spermio-genese-Zelltypen aus jeweils 4 Hodentubuli in den Stadien V, VII/VIII, X und XII behandelter und unbehandelter Tiere 32 Tage nach Versuchsbeginn

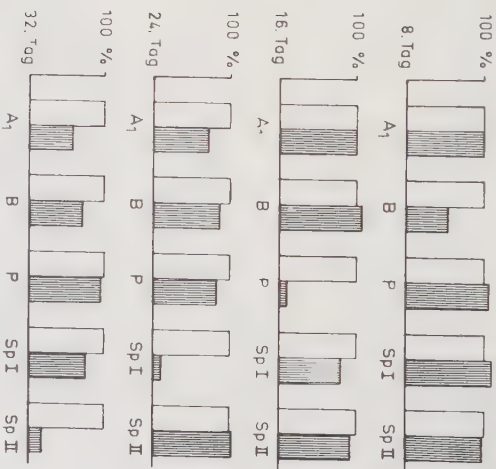
	Stadium V			Stadium VII/VIII			Stadium X			Stadium XII		
	U	B		U	B		U	B		U	B	
A ₁	1,75	1	=57%	1,5	1,75=117%							
A ₂							1,5	1,75=117%				
A ₃												
B	31,25	21,75=70%							6,0		3,5 = 58%	
R				39,75	37,75= 97%							
L							40,25	39,75= 99%				
Z												
P	38,5	36,75=95%		40,75	25,5 = 63%				41,5		37,25= 84%	
Sp I	105	77,25=74%		104,5	89,25= 85%		42,25	48,5 =107%	45,0		44,5 =110%	
Sp II	103,25	17,75=17%	**	107,25	5,25= ** 5%		114,75	116 = 97%	113,5		109 = 97%	

** signifikanter Unterschied bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

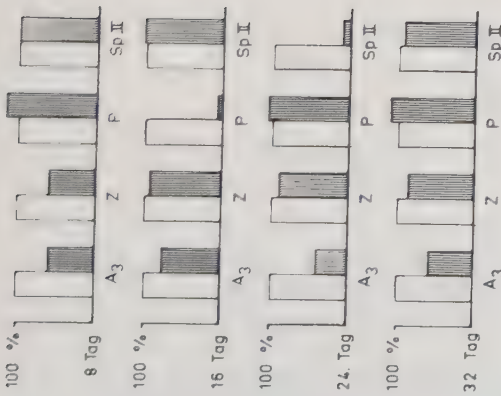
* " " " 5%



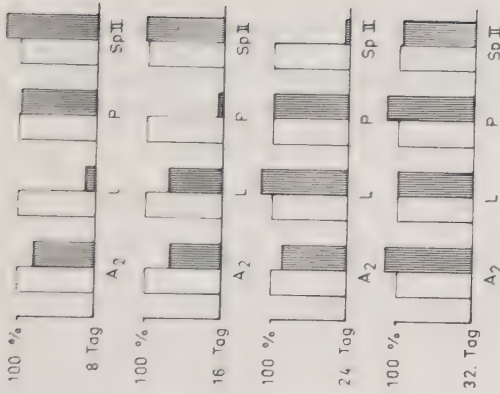
Darstellung 14: Vergleichende Darstellung der Tubuspopulationen des STADIUMS III/XIII der Hoden behandelte (100 %) und unbehandelte Tiere nach 8, 16, 24 und 32 Tagen. (Die schraffierten Säulen entsprechen den behandelten Hoden)



Darstellung 13: Vergleichende Darstellung der Tubuspopulationen des STADIUM IX der Hoden behandelte (100 %) und unbehandelte Tiere nach 8, 16, 24 und 32 Tagen. (Die schraffierten Säulen entsprechen den behandelten Hoden)



Darstellung 16: Vergleichende Darstellung der Tubuluspopulationen des STADIUMS XII der Hoden behandelter (100 %) und unbehandelter Tiere nach 8, 16, 24 und 32 Tagen. (Die schraffierten Säulen entsprechen den behandelten Hoden)



Darstellung 15: Vergleichende Darstellung der Tubuluspopulationen des STADIUMS I der Hoden behandelter (100 %) und unbehandelter Tiere nach 8, 16, 24 und 32 Tagen. (Die schraffierten Säulen entsprechen den behandelten Hoden)

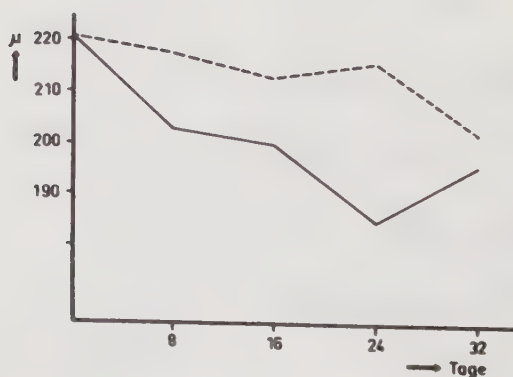
4.3.2. MESSUNG DER TUBULUSDURCHMESSER

Tab. 22: Mittlerer Tubulusdurchmesser + Standardabweichung nach Behandlung mit Cyclophosphamid und bei unbehandelten Tieren

Tage nach Versuchsbeg.	mittlerer Tubulusdurchmesser (u)		t
	Behandelte Tiere	Unbehandelte Tiere	
0 (t_0)	221 $\pm$ 0	221 $\pm$ 0	0
8 (t_2)	203 $\pm$ 28,38	218 $\pm$ 24,63	2,52 [*]
16 (t_4)	200 $\pm$ 22,99	213 $\pm$ 28,53	2,24 [*]
24 (t_6)	185 $\pm$ 17,20	216 $\pm$ 23,47	6,73 ^{**}
32 (t_7)	196 $\pm$ 28,21	202 $\pm$ 32,07	0,88

** = signifikanter Unterschied bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "



Darstellung 17: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der Hodentubulusdurchmesser behandelter (—) und unbehandelter (---) Tiere.

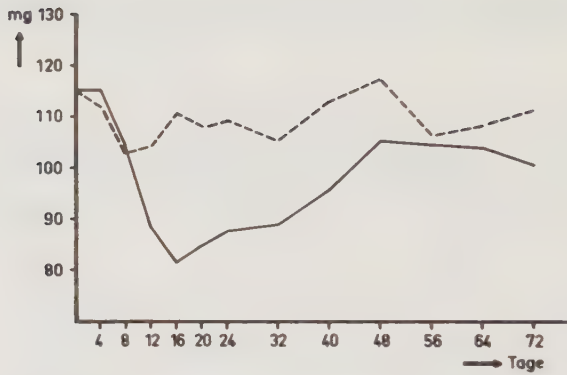
4. 4. HODENGEWICHTE UND IHRE STATISTISCHE BEURTEILUNG

Tab. 23: Mittlere Hodengewichte der mit Cyclophosphamid behandelten und unbehandelten Tiere $\pm$ Standardabweichung

Zeit nach Versuchsbeg.	Hodengewichte (g)		t
	Behandelte Tiere	Unbehandelte Tiere	
0 (t_0)	115,0		
4 (t_1)	114,9 $\pm$ 4,6	111,7 $\pm$ 15,8	0,39
8 (t_2)	104,7 $\pm$ 14,9	102,9 $\pm$ 10,1	0,19
12 (t_3)	88,3 $\pm$ 3,1	104,4 $\pm$ 6,0	4,71 **
16 (t_4)	81,9 $\pm$ 17,2	110,5 $\pm$ 12,5	2,67 *
20 (t_5)	84,8 $\pm$ 15,9	107,8 $\pm$ 4,7	2,76 *
24 (t_6)	87,8 $\pm$ 1,2	109,3 $\pm$ 13,9	3,07 *
32 (t_7)	89,0 $\pm$ 11,8	105,2 $\pm$ 4,4	2,55 *
40 (t_8)	95,1 $\pm$ 9,9	113,5 $\pm$ 9,9	2,61 *
48 (t_9)	105,3 $\pm$ 3,8	117,2 $\pm$ 9,5	2,30
56 (t_{10})	104,3 $\pm$ 1,9	106,3 $\pm$ 3,8	0,94
64 (t_{11})	103,8 $\pm$ 5,6	108,2 $\pm$ 6,9	0,97
72 (t_{12})	100,3 $\pm$ 11,1	111,1 $\pm$ 10,4	1,41

** = signifikanter Unterschied bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

* = " " " 5 % "



Darstellung 18: Vergleichende Darstellung der mittleren Hodengewichte behandelter (—) und unbehandelten (---) Tiere.

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

5.1. CYTOPHOTOMETRISCHE ERGEBNISSE

5.1.1. ERGEBNISSE DER FEULGEN-FÄRBUNG

Bei der Betrachtung der graphischen Darstellung der Mittelwerte der Feulgen-Anfärbbarkeit von Spermatozoen des HODENS zeigt sich, daß die Kurven sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Tiere erheblichen Schwankungen über die gesamte Versuchszeit unterworfen sind. In der Varianzanalyse erweisen sich diese Schwankungen der Mittelwerte als hoch signifikant und weisen auf Änderungen in der Feulgen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen hin. Nach der graphischen Darstellung imponieren diese Schwankungen besonders in den ersten 32 Tagen nach Versuchsbeginn.

Hier zeigt sich weiter, daß die Kurve der behandelten Tiere in den ersten 32 Tagen Schwankungen geringerer Amplitude unterliegt als die der unbehandelten Tiere.

Die Mittelwerte der behandelten Gruppen schwanken in charakteristischer Weise nur zwischen 8 und 10 AE über die gesamte Versuchszeit, während diese geringe Amplitude von 2 AE für die Kontrollgruppen nur in der zweiten Hälfte der Versuchszeit zu beschreiben ist. In den ersten 32 Tagen sind bei den Kontrollgruppen Schwankungen zwischen 7 und 12 AE festzustellen.

Vom 32. bis 56. Tag nach Versuchsbeginn ist eine ausgesprochene Parallelität des Kurvenverlaufs der behandelten und unbehandelten Gruppen zu beobachten, wobei die Mittelwerte der behandelten Tiere niedriger sind als die der unbehandelten Tiere, was sich vom 56. Tag bis Versuchsende im umgekehrten Verhältnis fortsetzt, bei Wahrung der beschriebenen Parallelität.

Über die gesamte Versuchszeit hingegen ist keine Abnahme der Extinktion festzustellen.

Die entsprechende graphische Darstellung der Werte für die Spermatozoen aus dem NEBENHODENKOPF erlaubt einen direkten Vergleich mit der Darstellung der Meßergebnisse des Hodens. Es zeigen sich auch hier starke Schwankungen der Mittelwerte sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Gruppen über die gesamte Versuchszeit, die sich auch in der statistischen Beurteilung als hoch signifikant erweisen.

Weiterhin sind starke Schwankungen der Mittelwerte der behandelten und der unbehandelten Tiere besonders in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn zu beschreiben, wobei die Schwankungen der Werte der unbehandelten Tiere ebenso wie auch bei den Meßergebnissen der Spermatozoen aus den Hoden wieder relativ stärker sind.

Die Schwankungsbreite ist nach dem 32. Tag bis Versuchsende geringer, was sich mit den Befunden bei den Spermatozoen aus dem Hodenausstrich deckt.

Die Mittelwerte der behandelten Gruppen schwanken zwischen 7 und 9 AE in den ersten 32 Tagen. Die Änderungen der Mittelwerte sind danach geringer.

Für die unbehandelten Tiere gilt: Die Werte der unbehandelten Tiere bewegen sich zwischen 7 und 10 AE in den ersten 32 Tagen; danach sind auch hier die Amplituden der Schwankungen geringer.

Da durch die Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen über die gesamte Versuchszeit nachgewiesen wurden, konnten die behandelten und unbehandelten Tiere jeweils als gemeinsame Gruppen betrachtet werden und mit den entsprechenden Gruppen des Nebenhodens verglichen werden.

Dabei ergab sich, daß sich die Mittelwerte der Meßergebnisse zwischen Hoden und Nebenhoden hochsignifikant unterscheiden, wobei die Werte für den Hoden über die gesamte Versuchszeit höher sind als die entsprechenden Nebenhoden-Mittelwerte.

5.1.2. ERGEBNISSE DER FASTGREEN-FÄRBUNG

Die Mittelwerte der Meßergebnisse aus den HODEN - Spermatozoen sind stark veränderlich über die gesamte Versuchszeit, und zwar sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Tieren. Diese Unterschiede beim Vergleich der Zeiten erweisen sich wiederum als hochsignifikant.

Ein charakteristischer Unterschied zwischen den ersten 32 Tagen und der zweiten Hälfte der Versuchszeit ist bezüglich der Fastgreen-Anfärbbarkeit nicht festzustellen.

Eine Abnahme der Extinktion, über die gesamte Versuchszeit betrachtet, ist ebenso wie bei der Feulgen-Färbung nicht zu beschreiben.

Die Mittelwerte der behandelten und unbehandelten Tiere schwanken zwischen 5 und 9 AE.

Bei der Beurteilung der Kurven der Mittelwerte der Messungen der Spermatozoen des NEBENHODENS ist zunächst wieder darauf hinzuweisen, daß die beschriebenen Änderungen der Mittelwerte über die Versuchszeit hoch signifikant sind.

Während in der ersten Hälfte der Versuchszeit behandelte und unbehandelte Gruppen stark schwanken (7 - 10 AE), ist die relativ geringere Änderung der Mittelwerte der behandelten Tiere vom 24. Tag nach Versuchsbeginn bis zum Versuchsende hervorzuheben.

Die aus der Kurve ersichtlichen Unterschiede der Mittelwerte zwischen behandelten und unbehandelten Tieren sind laut varianzanalytischer Darstellung nicht als signifikant anzusehen.

Werden dagegen die Werte der Spermatozoen des Hodens mit den entsprechenden Werten des Nebenhodens verglichen, so ergeben sich wiederum hochsignifikante Unterschiede für alle Entnahmetage. Dabei ist besonders hervorzuheben, daß bezüglich der Fastgreen-Anfärbbarkeit die Extinktionswerte für den Nebenhoden über die gesamte Versuchszeit über den Werten für die Spermatozoen aus dem Hoden liegen. Es besteht also auch ein statistisch zu belegendes reziprokes Verhältnis zwischen Hoden und Nebenhoden in der Feulgen- und Fastgreen-Anfärbbarkeit.

Dieser Sachverhalt sagt aus, daß die Spermatozoen aus dem Hoden einen höheren Gehalt an DNS, zumindest jedoch eine höhere Feulgen-Anfärbbarkeit aufweisen als die Spermatozoen aus dem Nebenhoden.

Die Fastgreen-Anfärbbarkeit, die den Gehalt der Spermatozoen an Histonen und basischen Proteinen dokumentiert, ist dagegen im Nebenhoden größer als im Hoden.

. 1. 3. ERGEBNISSE DER SAKAGUCHI-FÄRBUNG

Wurde bei der Naphthol-Yellow-Färbung auf die hohen Extinktionswerte im Hoden und Nebenhoden hingewiesen, so ist bei der Sakaguchi-Anfärbbarkeit, die den Arginin-Gehalt repräsentiert, auf geringe Extinktionswerte hinzuweisen.

Es handelt sich um Werte zwischen 6 und 8 AE, wobei in der Darstellung für die HODEN-Spermatozoen eine Parallelität der Kurven der behandelten und der unbehandelten Gruppen hervorzuheben ist. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Änderungen der Mittelwerte über die Zeit sind statistisch zu belegen und hochsignifikant.

Über die gesamte Versuchszeit gesehen scheinen die Schwankungen

der Mittelwerte - auch in der Darstellung für den NEBENHODEN - geringer zu sein als in den vorweg beschriebenen Färbungen. Ein signifikanter Unterschied des Arginingehaltes zwischen Hoden und Nebenhoden geht weder aus dem Kurvenverlauf noch aus der varianz-analytischen Darstellung hervor.

Das hebt sich von den Befunden der übrigen Färbungen ab.

5. 1. 4. ERGEBNISSE DER NAPHTHOL-YELLOW-FÄRBUNG

Die Mittelwerte dieser Messungen (HODEN - Spermatozoen), die die Anfärbbarkeit der Gesamtproteine des Kernes erfassen, liegen zwischen 10 und 13 AE und damit eindeutig über den Extinktionswerten der Feulgen- und Fastgreen-Färbung.

Dem Kurvenverlauf entsprechend liegen die Mittelwerte der behandelten Tiere in geringem Abstand unter den Werten der unbehandelten Tiere bis zum 48. Tag. Danach ist eine enge Parallelität beider Kurven bis Versuchsende zu beschreiben.

Die statistische Auswertung sagt, daß die Mittelwerte der behandelten und unbehandelten Tiere nicht signifikant unterschiedlich sind.

Bei der Beurteilung der Extinktionswerte der Spermatozoen des NEBENHODENS fällt zunächst auf, daß die Mittelwerte wie auch beim Hoden zwischen 10 und 13 AE schwanken. Diese Schwankungen der Mittelwerte zwischen den Entnahmetagen sind wieder hochsignifikant.

Es zeigen sich jedoch keine charakteristischen Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

Somit ergibt sich wieder die Möglichkeit, die Mittelwerte der behandelten und unbehandelten Tiere als eine Gruppe zu betrachten und auf diese Weise einen Vergleich der Mittelwerte zwischen Hoden

und Nebenhoden durchzuführen.

Hierbei sind die Extinktionsunterschiede wieder an allen Entnahmetagen hochsignifikant. Das weist auf einen unterschiedlichen Proteingehalt der Spermatozoen von Hoden und Nebenhoden hin.

Dieser Befund deckt sich mit der entsprechenden Darstellung in der Feulgen-Cytophotometrie, wo auch die Feulgen-Anfärbbarkeit im Hoden gegenüber dem Nebenhoden erhöht ist.

Weiterhin ist hervorzuheben, daß bei gleichzeitig höherem Proteingehalt der Spermatozoen aus dem Hoden der Gehalt an Kern- und Histonproteinen, wie aus der Darstellung für die Fastgreen-Anfärbbarkeit hervorgeht, im Hoden gegenüber dem Nebenhoden vermindert ist.

5. 2. HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE

5. 2. 1. SPERMIOGENESEZELLEN

An sämtlichen Entnahmetagen zeigen sich "Lücken" in den verschiedenen Zellschichten des Samenepithels.

Diese beobachteten Defekte können mit Hilfe der Einteilung eines Cyclus in zwölf Stadien, der Kenntnis des genauen prozentualen zeitlichen Anteils jedes einzelnen Stadiums an der Gesamtdauer eines Cyclus und der Zuordnung von bestimmten Zellkonfigurationen zu einem Stadium exakt zeitlich und zelltypisch determiniert werden. So läßt sich der Zelltyp und das Stadium errechnen, in dem sich die beurteilten Zellen zum Zeitpunkt der Applikation des Cyclophosphamid befanden.

Unter Berücksichtigung der Cyclusdauer von etwa 8 Tagen erscheint es sinnvoll, die Hodentubuli acht, sechzehn, vierundzwanzig und zweiunddreißig Tage nach Gabe des Cytostaticum zu untersuchen.

Wenn beispielsweise über den Im - Spermatogonien im Stadium III

ungefähr acht Tage nach der Cyclophosphamid-Applikation die pachytänen Spermatocyten im Stadium II deutlich vermindert sind oder fehlen, so kann man vermuten, daß die Im - Spermatogonien 8 Tage vorher entsprechend geschädigt wurden.

Diese Zellen haben sich nicht mehr weiterentwickelt und fallen nun als 'Lücken' in den verschiedenen Zellverbänden auf. Diese 'Lücken' rücken nun nach weiteren 8 Tagen in die Schicht der 'runden Spermatiden' vor und erreichen nach 24 Tagen die Lage der 'gestreckten Spermatiden' im Stadium XII.

8 Tage nach Versuchsbeginn (t_2) stellte sich im Stadium V eine deutliche Verminderung der B-Spermatogonien dar (49 %).

Die Schicht der Spermatocyten war in den Stadien VII/VIII, X und XII deutlich aufgelockert und reduziert.

Im einzelnen zeigte sich eine merkliche Verringerung der R-Spermatocyten im Stadium VII/VIII (34 %), der L-Spermatocyten im Stadium X (77 %) und der Z-Spermatocyten im Stadium XII (43 %).

Da das Cyclophosphamid in Dosen von 3×10 TE im Abstand von 48 Stunden appliziert wurde, muß dieser zeitliche Abstand von zwei Tagen bei der Zuordnung von möglichen Schädigungen zu bestimmten Stadien und Zellen berücksichtigt werden.

So waren die B-Spermatogonien im Stadium V am Tage der 1. Applikation (8 Tage vorher)

A_1 - Spermatogonien im Stadium VI,

am Tage der 2. Applikation (6 Tage vorher)

A_1 - Spermatogonien im Stadium VIII oder in

MA_1 im Stadium IX,

am Tage der 3. Applikation (4 Tage vorher)

A_2 - Spermatogonien im Stadium XI,
die gerade die MA_2 durchmachten.

Die R - Spermatocyten im Stadium VII/VIII befanden sich am Tage der

1. Applikation (8 Tage vorher)

als A_1 -Spermatogonien im Stadium VIII,

2. Applikation (6 Tage vorher)

als A_2 - oder A_3 -Spermatogonien (MA_2) im Stadium XI,

3. Applikation (4 Tage vorher)

als A_4 -Spermatogonien im Stadium I/II.

Die L-Spermatocyten im Stadium X waren am Tage der

1. Applikation (8 Tage vorher)

A_2 - oder A_3 -Spermatogonien (MA_2) im Stadium XI,

2. Applikation (6 Tage vorher)

A_3 - oder A_4 -Spermatogonien (MA_3) im Stadium I,

3. Applikation (4 Tage vorher)

Im - Spermatogonien, wahrscheinlich jedoch schon B - Spermatogonien (MIm) im letzten Drittel des Stadiums IV.

Die Z-Spermatocyten im Stadium XII waren zum Zeitpunkt der

1. Applikation (8 Tage vorher)

A_3 - oder A_4 -Spermatogonien (MA_3) im Stadium I,

2. Applikation (6 Tage vorher)

Im- oder B-Spermatogonien (MIm) im Stadium IV,

3. Applikation (4 Tage vorher)

R - Spermatocyten im Stadium VII.

16 Tage nach Versuchsbeginn (t_4) sind die pachytänen Spermatocyten in allen Stadien signifikant vermindert. Die Reduktion der pachytänen Spermatocyten im Stadium V (93 %), im Stadium VII/VIII (92 %) und in den Stadien X und XII (94 % bzw. 97 %) ist so auffällig, daß die Zellschicht der pachytänen Spermatocyten gar nicht mehr als 'Keimzellverband' imponiert.

Leicht vermindert sind außerdem noch die L-Spermatocyten im Stadium X und die R-Spermatocyten im Stadium VII/VIII, während die B-Spermatogonien im Stadium V und die Z-Spermatocyten im Normbereich liegen.

Weitere 8 Tage später, d. h. etwa 24 Tage nach der 1. Applikation hat sich die Zellage der signifikant reduzierten pachytänen Spermatocyten um eine Keimzellschicht weiter zur Tubulusmitte verschoben.

Dem Proliferationsmodus entsprechend ist nun eine relativ geringe Anzahl 'scheinbar' oder 'tatsächlich' nicht geschädigter Spermatiden herangewachsen.

Somit ist der Defekt bis in die Lage der Spermatiden vorgerückt und stellt sich hier als ein aufgelockerter, massiv reduzierter und nur noch andeutungsweise vorhandener Keimzellverband dar.

Im einzelnen bedeutet das eine signifikante Abnahme der 'runden Spermatiden' in den Stadien V, VII/VIII (92 % bzw. 97 %), sowie der elongierten Spermatiden im Stadium X (95 %) und XII (94 %).

Am letzten histologisch beurteilten Entnahmetag, 32 Tage nach der 1. Applikation, waren in der Schicht der elongierten Spermatiden deutliche Defekte zu erkennen.

Diese Schädigungen treten jedoch nur in den Stadien V und VII/VIII auf, da diese elongierten Spermatiden als Abkömmlinge der vor 28 Tagen (3. Applikation) 30 Tagen (2. Applikation) und 32 Tagen (1. Applika-

tion) betroffenen A_2 - bzw. A_3 - und möglicherweise auch A_1 -Spermatogonien entsprechend reduziert sind.

Im Gegensatz dazu befinden sich die elongierten Spermatiden der Stadien X und XII im Normbereich. Sie waren zum Zeitpunkt der Schädigung 'ruhende A_1 -Spermatogonien'.

Wenn man nun das Ausmaß der Cyclophosphamid-Schädigung in Relation setzt zu den betroffenen Zelltypen, so stellt man fest:

1. Es sind ausschließlich die Abkömmlinge der Zellen vermindert, die zur Zeit einer möglichen Schädigung Spermatogonien waren.
2. Spermatocyten und Spermatiden werden anscheinend von Cyclophosphamid in der gegebenen Dosierung nicht geschädigt.
3. Die Abkömmlinge der Zellen sind am deutlichsten reduziert, die sich zu den Zeitpunkten der drei Applikationen als Spermatogonien kurz vor einer Mitose befanden, sich teilten oder gerade die Teilung beendet hatten. So waren die B-Spermatogonien an den drei Applikationstagen A_1 -Spermatogonien, A_1 - oder A_2 -spg in der MA_1 und A_2 -spg, die gerade die MA_2 durchliefen. Es fallen also zeitlich zwei Mitosen der proliferierend-regenerierenden Reihe mit der 2. und 3. Applikation zusammen. Es ergab sich eine Reduzierung um 49 %.

Die R-Spermatocyten waren A_1 -spg, A_2 - oder A_3 -spg (MA_2) und A_4 -spg. Getroffen wurden folglich eine Mitose (MA_2), A_1 - und A_4 -spg. Es resultierte eine Verminderung um 34 %.

Als A_2 - bzw. A_3 -spg (MA_2), A_3 - oder A_4 -spg (MA_3) und als Im- oder B-spg (MIm) wurden die L-Spermatocyten geschädigt. Alle drei Cyclophosphamidgaben decken sich also mit Zellteilungsvorgängen. Deshalb auch die massive Abnahme um 77 %.

Die Z-Spermatocyten lagen als A_3 - oder A_4 -spg (MA_3), Im- oder B-spg (MIm) und als R-Spermatocyten vor.

Es fallen also zwei Mitosen in den Zeitraum der Schädigung.

Daraus ergab sich eine Abnahme der Z-Spermatocyten um 42 % gegenüber 100 % der Kontrolltiere.

4. Die geschädigten Zellen gehen nicht unmittelbar zugrunde, sondern erst nach ein oder zwei Cyclisdauern, wobei sie die entsprechenden Teilungen noch passieren.
5. Die Regeneration des Samenepithels war nicht erkennbar beeinflusst.

5.2.2. DURCHMESSER DER HODENTUBULI

Bei der Beurteilung des Verlaufs der Mittelwerte der Tubulusdurchmesser behandelter und unbehandelter Tiere über die Zeit von 32 Tagen nach Versuchsbeginn muß zunächst auf die deutlichen Unterschiede zwischen den mittleren Durchmesser der Tubuli behandelter und unbehandelter Tiere hingewiesen werden.

Dabei sind im einzelnen folgende Tatsachen zu berücksichtigen: Die mittleren Durchmesser der mit Cyclophosphamid behandelten Tiere sind, über die gesamte Versuchszeit betrachtet, geringer als die der Kontrolltiere. Dabei beträgt die Differenz der Mittelwerte nach 8 Tagen 15, nach 16 Tagen 13 und nach 24 Tagen sogar 31 μ . Am 32. Tag nach Versuchsbeginn beträgt die Differenz nur noch 6 μ .

Die Unterschiede der Mittelwerte nach 8 und 16 Tagen sind als signifikant, der Unterschied nach 24 Tagen als hochsignifikant anzusehen (t-Test).

Die errechneten Mittelwerte 32 Tage nach Versuchsbeginn sind nicht signifikant unterschiedlich.

Die Wirkung von Cyclophosphamid auf den Tubulusdurchmesser äußert sich demnach im Zeitraum vom 8. - 24. Tag nach Versuchsbeginn.

Weiterhin korreliert der zeitliche Verlauf der mittleren Tubulusdurchmesser mit dem Kurvenverlauf des mittleren Hodengewichts der mit Cyclophosphamid behandelten Tiere, das zwischen dem 12. und 40. Tag signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erniedrigt ist.

Zu erwähnen ist außerdem die Abnahme der mittleren Tubulusdurchmesser über die gesamte Zeit (32 Tage) sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Tiere.

Bei Versuchsbeginn betrug der mittlere Durchmesser $220\ \mu$, nach 32 Tagen nur noch $196\ \mu$ für die behandelten und $202\ \mu$ für die unbehandelten Tiere.

5. 3. HODENGEWICHTE

Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs der mittleren Hodengewichte zeigt sich eine Senkung der Kurve der behandelten Tiere vom 8. bis 40. Tag nach Versuchsbeginn.

Diese Gewichtsunterschiede der mit Cyclophosphamid behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten erweisen sich vom 12. bis 40. Tag als signifikant.

Dieser Einfluß von Cyclophosphamid auf das Hodengewicht stimmt zeitlich sowohl mit der Beeinträchtigung der Spermiogenese als auch mit der Verminderung des Tubulusdurchmessers überein.

6. DISKUSSION

Die cytophotometrischen Ergebnisse sind zunächst unter dem Gesichtspunkt des Einflusses von Cyclophosphamid auf den Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel zu beurteilen und in weiteren Überlegungen müssen die morphologischen Befunde mit diesen Ergebnissen verglichen werden.

Um den Einfluß von Endoxan auf den Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel beurteilen zu können, ist es wichtig, einen Einblick zu geben über den Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid einerseits und die Kopplung von Stoffwechselvorgängen (DNS-, Protein- u. Histonprotein-Synthese) andererseits.

Der Angriffspunkt des Cyclophosphamid ist die Desoxyribonucleinsäure-Synthese (PALME, LISS u. WIEBEL, 1964; MÜLLER, 1967; KABOTH, TREPEL, SCHICK, WERNEKE u. BEGEMANN, 1968; SCHUSTER, 1968; ENGELS, KROWKE u. NEUBERT, 1968; HILSCHER u. REICHELT, 1968; WHEELER u. ALEXANDER, 1969).

Somit ist als ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Einflusses von Cyclophosphamid auf proliferierende Gewebe, wie z.B. das Samenepithel, die Änderung der DNS-Synthese anzusehen.

Die Feulgen-Anfärbbarkeit und die mikrospektrophotometrischen Messungen geben uns die Möglichkeit, auf solche Änderungen zu schließen.

Es wurde zunächst auf die signifikanten Änderungen in der Feulgen-Anfärbbarkeit über die gesamte Versuchszeit hingewiesen, die für periodische Änderungen im DNS-Gehalt der Spermatozoen sprechen, wobei die relativ geringeren Schwankungen der behandelten Tiere möglicherweise auf direkte Wirkung des Cyclophosphamid zurückzuführen sind.

Die DNS-Synthese und damit die Stoffwechselkinetik - auch im Zellkern - und deren Einfluß auf die potentielle Anfärbbarkeit mit Feulgen-

Reagenz wird in den ersten 40 Tagen nach Versuchsbeginn beeinflußt, mit einer erkennbaren Abnahme der Feulgen-Anfärbbarkeit am 40. Tag.

Die Cyclophosphamid-Wirkung dürfte nach dem 40. Tag weitgehend wieder aufgehoben sein, was die ausgesprochene Parallelität der Kurven am Versuchsende dokumentiert. Dies läßt sich zumindest für die Feulgen-Cytophotometrie aussagen.

Desgleichen lassen sich bei den Spermatozoen aus den Nebenhoden signifikante Änderungen in der Feulgen-Anfärbbarkeit über die Zeit als ein Ausdruck periodischer Schwankungen im DNS-Gehalt interpretieren. Auch ist hier die Schwankungsbreite nach dem 32. Tag geringer, was in der gleichen Weise wie bei den Hoden-Spermatozoen gedeutet werden kann. Es zeigt sich, daß bei den applizierten Dosen von 3 mal 30 mg/kg in Abständen von 2 Tagen, also insgesamt 90 mg/kg, kein signifikanter Unterschied in der Feulgen-Anfärbbarkeit zwischen behandelten und unbehandelten Tieren über die gesamte Versuchszeit nachzuweisen ist.

Vergleicht man hiermit die autoradiographischen Untersuchungen von PALME (1962) an Mäusen nach Cyclophosphamid-Gaben mit ^3H -Thymidin, so zeigte sich bei einmaliger Gabe von 250 mg/kg Cyclophosphamid eine erhebliche Einbauhemmung von Thymidin in die Zellen der Lieberkühn'schen Krypten des Duodenums. Hingegen war der gleiche Effekt bei 80 mg/kg nicht mehr nachweisbar. Jedoch zeigte sich bei den Versuchen von PALME, daß Zellen des stratum basale der Zunge bei dieser Dosierung noch einen deutlich reduzierten Thymidineinbau haben.

Bei einer weiteren Herabsetzung der Cyclophosphamid-Dosis auf 30 mg/kg, d.h. einer in therapeutischen Bereichen liegenden Dosis, war in Zunge und Dünndarm kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren mehr festzustellen. Hingegen war in der Milz bei einer Cyclophosphamid-Dosis von 30 mg/kg noch ein deutlicher Einfluß auf

den ^3H -Thymidineinbau in die proliferierenden Zellelemente, besonders der roten Pulpa, autoradiographisch nachzuweisen.

Die Untersuchungen mit ^3H -Thymidin zeigen aktive Stoffwechselleistungen der Zelle, die Cytophotometrie hingegen erfaßt einen Zustand, z. B. Masse an DNS.

Unter diesem Vorbehalt, daß autoradiographische und cytophotometrische Messungen bezüglich ihrer Möglichkeiten, auch geringste Änderungen im DNS-Stoffwechsel noch zu erfassen, nicht unbedingt miteinander zu vergleichen sind, erscheint es uns sinnvoll, die Frage zu stellen, wie die von uns verwendeten Cyclophosphamid-Dosen bezüglich dieser Ergebnisse von PALME zu beurteilen sind. Unterschiedliche Befunde der einzelnen Untersuchungen können folgende Ursachen haben:

1. Die von uns applizierten Dosen führen zwar zu einer Verminderung des DNS-Gehalts der Spermatozoen, jedoch werden diese nicht ausreichend durch Veränderungen in der Feulgen-Anfärbbarkeit repräsentiert und sind somit quantitativ nicht zu erfassen.
2. Eventuelle Änderungen der Feulgen-Anfärbbarkeit liegen unterhalb der Meßgenauigkeit der Cytophotometrie.
3. Bei der cytophotometrischen Messung gelangen nur reife, anscheinend nicht geschädigte Spermatozoen zur Beurteilung, da die durch Cyclophosphamid geschädigten Zellen bereits im Verlauf der Spermiogenese zugrunde gehen.
4. Cyclophosphamid hat einen unterschiedlichen Einfluß auf die verschiedenen 'proliferierenden Gewebe'.

Die Untersuchungen von PALME zeigten, daß Cyclophosphamid-Dosen von 30 - 100 mg/kg durchaus in Bereichen liegen, die für einige Wechselgewebe noch ausreichend sind, nachweisbare Schädigungen zu setzen, andere Gewebe jedoch nicht mehr cytotoxisch beeinflussen.

Auch Untersuchungen von E. LISS (1962) mit ^3H -Thymidin (ebenfalls an Mäusen) bestätigen, daß bei Herabsetzung der Cyclophosphamid-Dosis auf 100 mg/kg keine Hemmung des ^3H -Thymidineinbaues in die DNS von Leber und Dünndarm mehr mit Sicherheit nachgewiesen werden kann.

Die von uns durchgeführte dreimalige Applikation in Abständen von 2 Tagen kann wahrscheinlich nicht die gleiche Wirkung haben wie eine einmalige Gabe von 90 mg/kg. An dieser Stelle ist auf die Arbeiten von DOEPFMER und SCHULER (1966) über die dosisabhängige Schädigung der Spermiogenese der Ratte hinzuweisen. Sie konnten zeigen, daß nach wiederholten niedrigen Einzeldosen Cyclophosphamid, 4 mg/kg an 10 Tagen, keine Hemmung der Spermiogenese auftrat. Hingegen bewirkte die einmalig injizierte Gesamtdosis eine reversible Schädigung der Zellabfolge in den Hodenkanälchen.

Im Zusammenhang mit diesen Überlegungen über den Einfluß des Cyclophosphamid auf die DNS müssen die Meßergebnisse aus der Fastgreen- und der Sakaguchi-Cytophotometrie betrachtet werden.

Das ergibt sich aus der engen Verknüpfung der DNS mit den Histonproteinen und dem Arginin.

ZUBAY und DOTY (1959) konnten zeigen, daß die Histone den Oberflächen der DNA-Moleküle angelagert sind und diese umschlingen. Diese enge Verbindung von Histonen mit der DNS läßt vermuten, daß die Histone eine wichtige Rolle bei der Genregulierung spielen (MEYHÖFER, 1963).

Bei der Beurteilung des Gehaltes von Histonproteinen eines Zellkerns ist stets die Betrachtung des Arginingehaltes einzubeziehen. Bei der letzten Teilung und der nachfolgenden Ausreifung erhält die Spermatide ein anderes Histon, das im Gegensatz zu den lysinhaltigen Histonen der Somazellen einen hohen Gehalt an Arginin hat. Diesen Histontyp

der haploiden Zelle bezeichnet man als Protamin (ALFERT, 1956). Protamine sind extrem basisch.

Die cytophotometrischen Messungen der Fastgreen-Anfärbbarkeit zeigen, wie auch bei der Feulgen-Cytophotometrie, die periodischen Schwankungen über die Versuchszeit. Zur Erklärung kann angeführt werden, daß durch die enge Verknüpfung von DNS und Histonen Schwankungen im DNS-Gehalt des Kerns auch entsprechende Schwankungen des Histongehaltes bedingen.

Durch die erwähnte enge Verknüpfung ist auch der Befund zu erklären, daß die Fastgreen-Anfärbbarkeit der behandelten Tiere sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollgruppen unterscheidet.

Ebenso verhalten sich die Werte der Sakaguchi-Cytophotometrie. Wenn man davon ausgeht, daß der größte Teil des Aminosäurebestandes der Histone Arginin darstellt, so muß auch bei der Sakaguchi-Färbung mit ähnlichen Ergebnissen wie bei der Fastgreen-Cytophotometrie gerechnet werden. In unseren Versuchen zeigte sich, daß keine signifikanten Unterschiede der behandelten Tiere gegenüber den Kontrollgruppen bestehen.

Bezüglich der Wirkung des Endoxans ist hervorzuheben, daß eine Verknüpfung zwischen DNS und Histonprotein-Synthese besteht.

Auf den Zusammenhang zwischen DNS und Histonprotein-Synthese wurde bereits in anderen Arbeiten hingewiesen (MIRSKY u. POLLISTER, 1946; ANSLEY, 1957; SANDRITTER u. SCHIEMER, 1958; BLOCH u. GODMAN, 1955; GRUNDMANN u. Mitarb., 1960).

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß die Extinktionswerte für die Fastgreen-Anfärbbarkeit der Spermatozoen aus den Nebenhoden im Bereich zwischen 7,5 und 10 Arbeitseinheiten (AE), bei Arginin dagegen zwischen 7 und 8 AE liegen.

Für die Spermatozoen des Hodens lassen sich diese Unterschiede nicht deutlich hervorheben.

Dieser Befund bei den Spermatozoen des Nebenhodens deckt sich mit Untersuchungsergebnissen von MURRAY (1964), die besagen, daß der Arginingehalt $2/3$ des basischen Proteins des Kernes ausmacht, oder daß der mittlere Arginingehalt lediglich um 22 % (35 %) niedriger liegt als der mittlere Histonproteingehalt (FISCHER u. KREUZER, 1958; BRIL-PERTERSEN u. WESTENBRINK, 1963).

Man kann daher bei einer gesteigerten Histonprotein-Synthese mit einer gesteigerten Arginin-Synthese rechnen (EHLERS, 1968).

Die Ergebnisse der Naphthol-Yellow-Färbung (DEITCH, 1955), die den Proteingehalt des Kernes repräsentiert, zeigen, daß die Extinktionswerte für die behandelten Gruppen ebenfalls nicht gegenüber den unbehandelten Gruppen reduziert sind. Wenn bezüglich der Naphthol-Yellow-Färbung die gleiche Aussage gemacht werden kann wie bei der Feulgen- und Fastgreen-Cytophotometrie, so läßt sich daraus vermuten, daß der Gesamtproteingehalt der Kerne der Spermatozoen nur in Verbindung mit einer Verminderung des DNS-Gehaltes reduziert werden dürfte.

Der hier aufgeführte Zusammenhang zwischen DNS, Histonprotein und Gesamtprotein ist auch durch cytophotometrische Untersuchungen an Ascites-Tumorzellen (LEDERER, 1966; LEDERER u. SANDRITTER, 1966) und cytophotometrische Ergebnisse an Basalepitheliumzellen von EHLERS (1968) und an menschlichen Spermatozoen von MEYHÖFER (1968) beobachtet worden.

Ebenso sind die charakteristischen Unterschiede der Extinktionswerte zwischen Hoden und Nebenhoden in diesem Zusammenhang zu sehen. Hervorzuheben ist das reziproke Verhältnis zwischen Fastgreen- und Feulgen-Anfärbbarkeit beim Vergleich zwischen Hoden und Nebenhoden. Auf diese Tatsache wurde in anderen Arbeiten hingewiesen (MEYHÖFER et al., 1971; HÜLSMANN, MORSCHEK, 1972).

Wenn der Arginingehalt der Spermatozoen im Hoden und Nebenhoden keine Unterschiede zeigt, muß man davon ausgehen, daß bereits die Spermatozoen im Hoden ihren endgültigen Histotyp (Protamin) erhalten haben.

Der Histongehalt ist im Nebenhoden deutlich erhöht, was durch einen verstärkten Einbau auch anderer Aminosäuren erklärt werden kann oder auf ein verändertes färberisches Verhalten der Spermatozoen aufgrund des veränderten Milieus im Nebenhoden zurückgeführt werden kann.

Die histologischen Befunde lassen die Wirkung des Cyclophosphamid auf das Keimepithel deutlich werden.

Cyclophosphamid schädigt vor allem die Spermatogonien. Spermatozyten und Spermatiden erweisen sich als sehr widerstandsfähig.

Die erzielten Defekte haben ihr morphologisches Äquivalent in einer veränderten Konfiguration der Zelltypen, die sich in einer Depopulation bestimmter Keimzellverbände äußert. Dieses Ergebnis läßt sich in die Untersuchungen von JACKSON et al. (1955), CRAIG et al. (1958), STEINBERGER et al. (1959) und SHERMAN et al. (1960) einreihen, die über eine Abnahme der Fertilität von Ratten- und Mäusemännchen nach Behandlung mit dem alkylierenden Cytostaticum Triäthylmelamin (TEM) berichten. Es wurden in erster Linie Spermatogonien, aber auch Spermatozyten und Spermatiden geschädigt.

Neuere experimentelle Arbeiten von DOEPFMER et al. (1966) sowie von HILSCHER und REICHELT (1968) u. MAUS (1970) stimmen ebenfalls mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

HILSCHER und REICHELT (1968) fanden nach einmaliger Applikation von 100 mg pro kg Ratte Cyclophosphamid (etwa 50 % der LD₅₀) deutliche Defekte im Bereich der Abkömmlinge der betroffenen A₂-, A₃- und A₄-Spermatogonien.

200 mg Cyclophosphamid pro kg Ratte (95 % der LD_{50}) führen zu einer starken Verminderung sämtlicher A-Spermatogonien, mit Ausnahme der A_1 -Spermatogonien. Auch die Abkömmlinge der Im- und B-Spermatogonien sind hochgradig reduziert. Die Spermatozyten werden nicht so deutlich geschädigt.

Im Gegensatz zu diesen hohen Einzeldosen erscheint die von uns gewählte Dosis von 30 mg Cyclophosphamid pro kg Maus (14 % der LD_{50}) als klein. Diese Einzeldosis wurde dreimal im Abstand von 48 Stunden appliziert.

Trotzdem zeigen sich hier Defekte, die den Ergebnissen von HILSCHER und REICHELT bei einer Einzeldosis Cyclophosphamid von 100 mg pro kg Ratte (etwa 50 % der LD_{50}) entsprechen. Daraus könnte man schließen, daß eine dreimalige Schädigung einer Zelle mit einer bestimmten Cyclophosphamid-Dosis die gleichen definierten Defekte verursacht wie die Applikation der Gesamtmenge als Einzeldosis. Sicher muß bei dieser Betrachtung der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Gaben berücksichtigt werden.

DOEPFMER et al. (1966) konnten hingegen zeigen, daß für das Ausmaß einer Schädigung die Höhe der Einzeldosis und nicht die Gesamtmenge von Cyclophosphamid entscheidend ist.

Wie aus unseren Ergebnissen hervorgeht, sind die Abkömmlinge gerade jener Spermatogonien am stärksten reduziert, die sich zu den Zeitpunkten der drei Cyclophosphamid Gaben jeweils kurz vor einer Mitose befanden, sich gerade teilten oder eine Teilung beendet hatten. Diese Beziehung zwischen Zellteilungsvorgängen und Applikation findet ihre Ursache im Wirkungsmechanismus des Cyclophosphamid. Dieses alkylierende Cytostaticum hemmt nämlich die DNS-Synthese (s. o.).

HILSCHER et al. (1968) zeigen, daß Cyclophosphamid die Spermatogonien und Spermatozyten in der S-Phase, vor allem zu Beginn der

S-Phase, aber auch am Ende der G_1 -Phase schädigt. Dieser Zeitpunkt ist für eine Schädigung von proliferierenden Zellen besonders günstig, da neben der DNS-Synthese auch noch die Synthese der RNS und der PROTEINE in der G_1 -, S- und G_2 -Phase stattfindet (BLOOM, FAWCETT, 1968), die ebenfalls noch im Sinne einer Hemmung oder Störung beeinflußt werden könnte.

Daraus ergibt sich, daß neben der Höhe der Dosis, besonders der Einzeldosis, der von Cyclophosphamid unmittelbar getroffene Zeitabschnitt im Generationscyclus einer Spermatogonie die entscheidende Bedeutung für das Ausmaß eines Defektes hat.

So finden wir 8 Tage nach Versuchsbeginn eine Dezimierung der L-Spermatozyten um 87 %, da die Vorläufer dieser Keimzellen als Spermatogonien in den Mitosen MA_3 , MA_2 und MIm von jeweils einer Cyclophosphamid-Applikation geschädigt wurden.

Aus den unterschiedlichen Zellpopulationen der verschiedenen Keimzellschichten in einem Proliferationscyclus wird deutlich, daß Keimzellen nicht sofort nach einer Schädigung zugrunde gehen können, sondern erst eine oder zwei Cyclusdauern später.

So gehen möglicherweise geschädigte A_3 - oder A_4 -Spermatogonien erst nach erfolgter Reifeteilung als R- oder Z-Spermatozyten zugrunde.

Auffällig ist, daß die Folgegenerationen in allen Keimzellschichten eine normale Population zeigen. Daraus folgt, daß Cyclophosphamid in der applizierten Dosis die Regeneration des Keimepithels nicht oder nur unwesentlich beeinflußt. Der zweite Proliferationsschub entspricht bereits zahlenmäßig wieder dem der Kontrolltiere.

HILSCHER et al. (1968) konnten jedoch auch nachweisen, daß sogar die Gabe von 95 % der LD_{50} des Cyclophosphamid zwar zu einer starken Zellabnahme des ersten Proliferationsschubs führt, die Population der zweiten Generation jedoch bereits deutlich erhöht ist und

schon der dritte Proliferationsschub zahlenmäßig dem des Kontrolltieres entspricht.

Dieser Befund steht in deutlichem Gegensatz zu experimentellen Arbeiten, die sich mit dem Einfluß ionisierender Strahlen auf die Spermatogenese von Ratten und Mäusen befaßt haben.

Hier wurde nachgewiesen, daß sich die Repopulation der Tubuli in dem Maße verzögert, je größer die verabfolgte Strahlendosis ist (TRAUTMANN, 1963).

Diese Gegenüberstellung definierter Schädigungen cytostatischer alkylierender Substanzen einerseits und die einer Behandlung mit ionisierenden Strahlen andererseits erscheint uns im Hinblick auf die heute in der Klinik übliche radiologisch - cytostatische Kombinationsbehandlung von Bedeutung.

Besonders auch deshalb, da die alkylierenden Cytostatica als "Radiomimetika" und ihre Wirkungen sowohl in biochemischer als auch morphologischer Hinsicht den Wirkungen ionisierender Strahlen in sehr vielen Beziehungen gleichen (DUSTIN, 1946; BARTH et al., 1966).

Diese Übereinstimmung gilt jedoch nicht für die Beeinflussung der Regeneration des Keimepithels.

Hier zeigen sich deutliche Unterschiede bei einem Vergleich der Regenerationszeiten einmal nach Behandlung mit Cyclophosphamid und zum anderen nach Bestrahlung mit schnellen Elektronen.

Eine Erklärung dafür liegt möglicherweise im Vorkommen zweier verschiedener Zellreihen im Spermiogenesecyclus.

Die regenerierend-proliferierende Reihe bildet neue A_1 -spg heran, während am Ende der differenzierenden Reihe die elongierten Spermatiden stehen.

Die Aufspaltung in diese beiden Zellreihen ist an einer zeitlich und räumlich determinierten Stelle im Spermiogenesecyclus lokalisiert, den HILSCHER und REICHEL (1968) als Weichenstelle (switch point) bezeichnen. Es ist nun denkbar, daß diese Weichenstelle, die das quantitative Verhältnis von regenerierend-proliferierender Reihe und differenzierender Reihe bestimmt, z. B. durch eine Schädigung des Spermatogoniensystems so beeinflußt wird, daß die regenerierend-proliferierende Reihe dominiert.

Es werden somit vermehrt A_1 -spg gebildet, die die geschädigte Matrix des Keimepithels wieder auffüllen.

Cyclophosphamid scheint nun diese Weichenstelle und somit auch die Regeneration des Samenepithels nicht oder nur unwesentlich zu beeinflussen, während nach einer Strahlenbehandlung eine Beeinträchtigung denkbar erscheint.

Ein anderer Grund für die nicht gestörte Regeneration liegt möglicherweise in der Unempfindlichkeit der Zellen, die das morphologische Substrat der Regeneration des Samenepithels darstellen. Es muß sich dabei um die Zellen handeln, von denen die A_1 -Spermatogonien abstammen. Nach MONESI (1962) sind dies "ruhende" A_1 -spg, nach CLERMONT A_3 -spg (1962) und A_4 -spg (1966); HILSCHER beschreibt eine teilweise Herkunft von Im-spg und von hypothetischen A_5 -spg, während sich nach CLERMONT und BUSTOS-OBREGON (1968), CLERMONT und DYM (1969) und DE ROOIJ (1970) die A_1 -Spermatogonien von A_0 -Spermatogonien ableiten.

Bei der Darstellung der Tubulussmessungen wurde darauf hingewiesen, daß die Reduktion des Tubulussdurchmessers behandelter Tiere im Zeitraum vom 8. bis zum 24. Tag nach Versuchsbeginn erfolgt. Daraus kann geschlossen werden, daß in dieser Zeit eine erhebliche Reduktion des germinativen Epithels infolge der Cyclophosphamid-Applikation erfolgt ist.

Tatsächlich korreliert dieses Ergebnis eindeutig mit dem histologischen Befund, der besagt, daß vom 8. bis 32. Tag die Zellpopulation entscheidend reduziert ist; indem nämlich am 8. Tag die B-Spermatogonien, R-, L- und Z-Spermatozyten, am 16. Tag die Schicht der pachytänen Spermatozyten, am 24. Tag eine signifikante Abnahme der runden und elongierten Spermatiden und schließlich am 32. Tag eine Abnahme ausschließlich der elongierten Spermatiden zu verzeichnen ist.

Weiterhin korreliert der zeitliche Verlauf der mittleren Tubulusdurchmesser mit dem Kurvenverlauf des mittleren Hodengewichtes der mit Cyclophosphamid behandelten Tiere, das zwischen dem 12. und 40. Tag signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erniedrigt ist. Hingegen ist der Abfall der Kurve der mittleren Tubulusdurchmesser sowohl der unbehandelten als auch der behandelten Gruppen über die gesamte Zeit nicht mit der Cyclophosphamid-Wirkung zu erklären.

Der Tubulusdurchmesser kann grundsätzlich durch drei Faktoren reduziert sein:

1. Verminderte Flüssigkeitsproduktion der Sertoli-Zellen, die mit der Cyclophosphamid-Wirkung in Verbindung gebracht werden könnte (SETCHEL, 1969). Damit fällt der Binnendruck im Inneren des Tubulus ab und die Elastizität der Tubuluswand bedingt die Reduktion des Durchmessers (BURGOS, VITALE-CALPE u. AOKI, 1970).
2. Wachstumsdruck von außen durch Zunahme des Zwischengewebes.
3. Veränderung durch Verminderung der Zellpopulation des Samenepithels.

Über die Bedeutung der ersten beiden Faktoren können keine Aussagen gemacht werden, da es nicht innerhalb der Zielsetzung des Versuches

lag. Dagegen kann der Einfluß des dritten Faktors auf den Tubulusdurchmesser durch unsere Versuche belegt werden, nämlich Reduktion des Durchmessers durch Abnahme der Zellpopulation.

Es wurde bereits über die signifikante Gewichtsabnahme der Hoden zwischen dem 8. und 40. Tag nach Cyclophosphamid-Gaben berichtet. Außerdem wurde auf die zeitlich korrelierenden Befunde bei Messung der Tubulusdurchmesser und Beurteilung der histologischen Präparate hingewiesen.

RINGLEB u. Mitarb. (1968) sehen in der Gewichtsabnahme der Hoden von Mäusen nach Cyclophosphamid-Behandlung ein Äquivalent der tubulären Schädigung und Depopulation, und somit ein Maß für die relative germinative Insuffizienz des Hodens nach cytostatischer Behandlung.

7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Männlichen Mäusen wurde 3 mal 30 mg pro kg Cyclophosphamid (3×10 TE) in Form einer 2 %igen Lösung in Abständen von 48 Stunden i. p. appliziert. Über den Zeitraum von 72 Tagen nach der ersten Applikation wurden bis zum 24. Tag in Abständen von 4 Tagen, danach in Abständen von 8 Tagen jeweils 2 behandelte und unbehandelte Tiere getötet, die Hoden gewogen, Ausstrichpräparate von Hoden und Nebenhoden angefertigt und histologische Schnitte der Hoden hergestellt.
2. 40000 Spermatozoen wurden cytophotometrisch untersucht auf:
 - a) Feulgen-Anfärbbarkeit (DNS)
 - b) Fastgreen-Anfärbbarkeit (Histonprotein)
 - c) Sakaguchi-Anfärbbarkeit (Arginin)
 - d) Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit (Gesamtprotein)
3. Anhand von histologischen Untersuchungen wurde die Cyclophosphamid-Wirkung auf die Spermiogenese und den Tubulusdurchmesser beurteilt.
4. Weiterhin wurden die Hodengewichte als Parameter einer möglichen Schädigung bestimmt.
5. Die Cytophotometrie zeigt signifikante Änderungen der Anfärbbarkeit in allen vier Färbungen aller Tiere über die gesamte Versuchszeit von 72 Tagen. Es zeigen sich hochsignifikante Unterschiede in der Anfärbbarkeit zwischen Hoden und Nebenhoden in allen Färbungen, außer der Sakaguchi-Färbung. Fastgreen- und Feulgen-Anfärbbarkeit verhalten sich beim Vergleich zwischen Hoden und Nebenhoden reziprok. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen erweisen sich statistisch als nicht signifikant.

6. Die histologischen Befunde (Zählung der Spermiogenesezellen) zeigen an sämtlichen Entnahmetagen (bis zum 32. Tag nach Versuchsbeginn) Lücken in den verschiedenen Zellschichten des Samenepithels. 8 Tage nach Versuchsbeginn ist die Zahl der B-Spermatogonien, so wie die Schicht der R-, L-, Z-Spermatozyten in den entsprechenden Stadien deutlich aufgelockert und reduziert. Nach 16 Tagen sind die pachytänen Spermatozyten in allen Stadien signifikant vermindert. Am 24. und 32. Tag sind in der Keimzellschicht der Spermatiden deutliche Defekte zu erkennen.
7. Die Tubulusdurchmesser waren vom 8. bis 24. Tag nach der ersten Applikation von Cyclophosphamid signifikant verkleinert.
8. Die Hodengewichte der behandelten Tiere waren in dem gleichen Zeitraum signifikant vermindert.
9. Die unterschiedlichen histologischen und cytophotometrischen Befunde werden mit der Möglichkeit erklärt, daß bei der cytophotometrischen Messung anscheinend nur 'intakte' Spermatozoen zur Messung gelangten, d. h., daß aus den geschädigten Spermiogenesezellen keine Spermatozoen hervorgehen.

Es wird weiterhin diskutiert, ob die von uns applizierte Cyclophosphamid-Dosis ausreichend war, um cytophotometrisch nachweisbare Schädigungen der Spermatozoen zu setzen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ALFERT, M.: Changes in the staining capacity of nuclear components during cell degeneration.
Biol. Bull. 109, 1-12 (1955)
- ALFERT, M., and I.I. GESCHWIND: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 59, 991-999 (1953)
- ANSTEY, H.R.: A cytophotometric study of chromosome pairing.
Chromosoma (Berl.) 8, 380 (1957)
- ASCHOFF, J.: Die Bedeutung der Tagesperiodik für Tierhaltung und Tierexperiment.
In: Die Umwelt der Versuchstiere, hrsgb. v. Weihe,
Berlin-Stuttgart 43 (1964)
- BLOCH, D.P., and G.C. GODMAN: A microspectrophotometric study of synthesis of DNA and nuclear histone.
J. biophys. bioch. Cytol. 1, 17 (1955)
- BRIL-PETERSEN, E., and H.G.K. WESTENBRINK: A structural basic protein as a counterpart of desoxyribonucleic acid in mammalian spermatozoa.
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 76, 152 (1963)
- BROCK, N., und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus.
Naturwissenschaften 49, 610-611 (1962)
- BROCK, N., und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro.
Arzneimittelforsch. 13, 1021-1031 (1963)

- BURGOS, M.H., R. VITALE-CALPE, and A. AOKI: Fine structure of the testis and its functional significance.
In: The Testis I, ed. by A.D. Johnson, W.R. Gomes, and N.L. Vandemark, Academic Press, New York and London 553 (1970)
- CLERMONT, Y., and M. TROTT: Duration of the cycle of seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of ^3H -Thymidine and radioautography.
Fertil. Steril. 20, 805-817 (1969)
- CRAIG, A.W., B.W. FOX, and H. JACKSON: Sensivity of the Spermatogenic Process in the Rat to Radiomimetic Drugs and X-Rays.
Nature 181, 353 (1958)
- DEELEY, E.M.: An integrating microdensitometer for biological cells.
J. Sci. Instr. 32, 263-267 (1955)
- DEITCH, A.D.: An improved Sakaguchi reaction for microspectrophotometric use.
J. Histochem. Cytochem. 9, 477 (1961)
- DOEPFMER, R., und W. SCHULER: Experimentelle Untersuchungen an Ratten über dosisabhängige Schädigung der Spermiogenese und der Leukopoese sowie ihrer Korrelation zueinander durch die Zytostatika Cyclophosphamid und 2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon - (1,4).
Arzneim.-Forsch. 16, 1533-1535 (1966)
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, M. NAKAYAMA, R. PREUSSMANN und K. ANGER: Beiträge zum Dosisproblem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise des Endoxans.
In: Chemotherapie maligner Tumore, hrsg. von H. Wilmanns. Schattauer Verlag Stuttgart, 11 (1964)

- EHLERS, G.: Vergleichende quantitativ-cytochemische Untersuchungen über den Desoxyribonukleinsäure- und Nucleohistongehalt von Basalzellepitheliomen.
Arch. f. klin. u. experim. Dermatologie 232, 102-118 (1968)
- EHLERS, G.: Cytophotometrische Messungen des Gesamtproteingehaltes in Zellkernen von Basalzellepitheliomen.
Arch. f. klin. u. experim. Dermatologie 233, 90-98 (1968)
- EHLERS, G.: Quantitativ-histochemische Untersuchungen über den Arginingehalt von Basalzellepitheliomen.
Arch. f. klin. u. experim. Dermatologie 232, 413-426 (1968)
- ENGELS, K., R. KROWKE und D. NEUBERT: Vergleichende Untersuchungen über die Alkylierung von embryonalem und mütterlichem Gewebe durch Cyclophosphamid.
Arch. exp. Path. Pharm. 260, 110-111 (1968)
- FISCHER, H., und L. KREUZER: Über Gallin.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 293, 176 (1958)
- FOLEY, G.E., O.M. FRIEDMANN and B. P. DROLET:
Studies on the mechanism of action of Cytosan.
Evidence of activation in vivo and in vitro.
Cancer Res. 21, 57-63 (1961)
- GRUNDMANN, E., und G. BACH: Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach partieller Hepatektomie.
Beitr. Path. Anat. 123, 144 (1960)
- GRUNDMANN, E., und H. P. HOBIG: Die Mikrospektrophotometrie der Zelle im sichtbaren Spektralbereich.
Dtsch. med. Wschr., 88. Jg., 98-103

GRUNDMANN, E., H. G. HILLEMANN und K. RHA: Zur Zytogenese des Portiokarzinoms nach cytophotometrischer Untersuchung.

Verh. dtsch. Ges. Path. 1960, 216

GLEDHILL, M. P., Jr. R. RIGLER und N. R. RINGERTZ:

Changes in desoyribonucleoprotein during spermatogenesis in the bull.

Experimental Cell Research 41, 652-665 (1966)

HAGEMANN, E. u. G. SCHMIDT: Ratte und Maus.

Berlin 1960, 318

HILLEMANN, H. G.:

Habilitationsschrift, Freiburg 1960

HILSCHER, W. und H. -B. MAKOSKI: Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur "Präsertmatogenese" und "Spermatogenese" der Ratte.

Zeitschr. für Zellforsch. 86, 327-350 (1968)

HILSCHER, W. und P. REICHELT: Untersuchungen am Samenepithel der Ratte nach Gaben von "Endoxan" und "Natulan".

Beitr. path. Anat. 137, 452-478 (1968)

HÜLSMANN, B., und H. MORSCHEK: Halbquantitative cytophotometrische Bestimmungen des Desoxyribonukleinsäure-, des Histonprotein-, des Arginin- und des Gesamtproteingehaltes in Spermatozoen bestrahlter Mäusetestes.

Inaugural-Dissertation Giessen 1971

JACKSON, H., und M. BOCK: Effect of Triethylene Melamine on the Fertility of Rats.

Nature 175, 1037 (1955)

JACKSON, H., B.W. FOX, and A. CRAIG: The effect of alkylating agents on male rat fertility.

Brit. J. Pharm. 14, 149 (1959)

KABOTH, W., F. TREPEL, P. SCHICK, G. WERNEKKE und H. BEGEMANN:

I. Morphologische und funktionelle Veränderungen im Blutzellsystem mit zytostatischen Substanzen und Prednisolon.

II. Veränderungen der Zellzusammensetzung sowie der DNS-, RNS- und Proteinsynthese in blutbildenden Organen.

Z. ges. exp. Med. 148, 306-336 (1968)

LEDERER, B.: Simultane quantitativ-histochemische Darstellung von Desoxyribonukleinsäure, Histon- u. Gesamtprotein an normalen und Tumorzellen.

Verh. dtsch. Ges. Path. 1966, 453

LEDERER, B., K. JOBST und W. SANDRITTER: Die Feulgen-Reaktion bei der Langzeithydrolyse: Der Einfluß von Histonproteinen.

Acta histochemica 24, 379-381 (1966)

LEDERER, B., und W. SANDRITTER: Sukzedane zytophotometrische Bestimmung von Desoxyribonukleinsäure, Histon- und Gesamtprotein.

Histochemie 7, 288 (1966)

LISS, E.: Biochemische Untersuchungen über den Einfluß des Endoxans auf die Nukleinsäuresynthese.

In: Chemotherapie maligner Tumore, hrsg. v. H. Wilmanns, Schattauer Verlag Stuttgart, 133-136 (1964)

MEYHÖFER, W., R. HERRMANN und W. KNOTH: Über Ultraviolett-Absorptionsmessungen an Spermatozoen.

Arch. f. klin. u. experim. Dermatologie 209, 637-642 (1960)

MEYHÖFER, W.: Basische Proteine in Spermienköpfen fertiler und infertiler Männer.

XIII. Congressus Internationalis Dermatologiae - München 1967
Berlin Göttingen Heidelberg New York (Springer Verlag)
1968

MEYHÖFER, W.: Untersuchungen an menschlichen Hodenzellen mittels Ultraviolett-Spektrometrie.

Suppl. zu: "Beiträge zur Fertilität u. Sterilität".
Zeitschr. f. Geburtshilfe, Bd. 157

MEYHÖFER, W.: Mikrospektrophotometrische Messungen des Nucleinsäuregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Männer.

Arch. f. klin. u. experim. Dermatologie 216, 556-614
(1963)

MIRSKY, A.E., and A.W. POLLISTER: Chromasin, desoxyribose nucleoprotein complex of cell nucleus.

J. gen. Physiol. 30, 117 (1946)

MONESI, V.: Ribonucleic acid and protein synthesis during differentiation of male germ cells in the mouse.

Archives d'Anatomie microscopique Tome 56, 1967;
Suppl. au n^o 3-4, pp. 61-74

MONESI, V.: Synthetic activities during Spermiogenesis in the mouse RNA and protein.

Experimental Cell Research 39, 197-225 (1965)

MÜLLER, D.: Die Beeinträchtigung der Leukozytenfunktion durch die medikamentöse Tumorbehandlung.

Krebsforschung und Krebsbekämpfung VI, Urban u. Schwarzenberg; München - Berlin - Wien, 380-384 (1967)

MURRAY, K.: Basic proteins of cell nuclei.

In: The nucleohistones.

San Francisco: Holden-Day Inc. 1964

OAKBERG, E.: Deviation of Spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium.

Amer. J. of Anat. 99, 507-516 (1956)

OAKBERG, E.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal.

Amer. J. of Anat. 99, 391-409 (1956)

PALME, G.: Die Beeinflussung der DNS-Synthese durch Endoxan.

Autoradiographische Untersuchungen mit tritiummarkiertem Thymidin.

In: Chemotherapie maligner Tumore, hrsg. v. H. Wilmanns. Schattauer Verlag Stuttgart, 125-131 (1964)

PALME, G., E. LISS und F. WIEBEL: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß alkylierender Zytostatika auf den Generationszyklus normaler Wechselgewebe und Aszites-tumorzellen.

Radionukleide in der klinischen u. experimentellen Onkologie.

2. Jahrestagung der Gesellschaft für Nuklearmedizin in

Heidelberg, 22.-24.10.1964. S. 39-45

RINGLEB, D.: Untersuchungen zum Verständnis der Problematik radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung.

Strahlenther. 135, 597-601

RINGLEB, D.: Experimente zur Problematik radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung.

Habil. Schrift Giessen, 1967

- DE ROOIJ, D.G.: Some observations on the A₀ Spermatogonia of the mouse.
In: Morphological aspects of andrology Vol. I, 17-20,
by A.F. Holstein and E. Horstmann; Grosse Verlag Berlin
- SAKAGUCHI, S.: Über eine neue Farbreaktion von Protein und Arginin.
J. Biochem. (Tokyo) 5, 25 (1950)
A new methodic for colometric determination of arginine.
J. Biochem. (Tokyo) 5, 37, 231 (1950)
- SANDRITTER, W.: Ultraviolett-mikrospektrophotometrie.
Handbuch der Histochemie Bd. I, 1, 220-338, G. Fischer
Verlag Stuttgart (1958)
- SANDRITTER, W., und G. KIEFER: Methoden und Ergebnisse der
Zytophotometrie und Interferenzmikroskopie.
Acta histochemica, Supplementband VI.
- SANDRITTER, W., und H.G. SCHIEMER: Histochemische Untersuchungen an Hela-Zellen.
Verh. dtsh. Ges. Path. 42, 449 (1958)
- SCHUSTER, R.: Auswirkungen der kombinierten Anwendung von
Cyclophosphamid und ionisierenden Strahlen auf Proliferationsvorgänge normaler Gewebe.
Strahlenther. 135, 48-58 (1968)
- SETCHEL, B.P.: Do Sertoli cells secrete the rete testis fluid?
J. Reprod. Fertility 19, 391 (1969)
- SHERMAN, I.K., und E. STEINBERGER: Effect of triethylene-melamine on the reproductive capacity of mouse spermatozoa.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 348 (1960)

- SIBATANI, A.: Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of desoxypentose nucleic acid. III. Effects of histone on the Feulgen reaction in vitro.
Journal of Biochemistry 40, 119-134 (1953)
- STEINBERGER, E.: A quantitative study of the effect on an alkylating agent (triethylenemelamine) on the semiferous epithelium of rats.
J. Reprod. Fertil. 3, 250 (1962)
- STEINBERGER, E., W.O. NELSON, A. BOCABELLA and W.J. DIXON:
A radiomimetic effect of triethylenemelamine on reproduction in the male rat.
Endocrinology 65, 40 (1959)
- TRAUTMANN, J.: Strahlenwirkungen auf die Hoden.
In: *Strahlenpathologie der Zelle*, hrsg. v. E. Scherer u. H.-S. Stender, Stuttgart 195 (1963)
- WHEELER, G.P., und J.A. ALEXANDER: Wirkungen von Stickstoff-Lost und Cyclophosphamid auf die DNS-Synthese in vivo und in zellfreien Zubereitungen.
Canc. Res. 29, 98-109 (1969)
- ZUBAY, G., and P. DOTY: The isolation and properties of desoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acid molecules.
J. Mol. Biol. 1, 20 (1959)

LEBENS LAUF

Name: Wolfgang Hermann Diehl

Geburtstag: 25. Oktober 1946

Geburtsort: Asslar, Krs. Wetzlar

Religion: evangelisch

Eltern: Karl-Walter Diehl;
Hilde geb. Geus
wohnhaft in 6332 Ehringshausen, Kirchberg 5

Beruf des Vaters: Justizbeamter

Schulbesuch: 1. Ostern 1953 bis Ostern 1957 Volksschule
in Ehringshausen, Krs. Wetzlar
2. Ostern 1957 bis August 1963 Gymnasium
in Wetzlar
Gymnasium in Dillenburg bis Februar 1966
Abschluß: Abitur am 17. 2. 1966

Universität: 1. Studium der Veterinärmedizin
April 1966 bis Herbst 1966
an der Justus Liebig-Universität in Giessen
2. Studium der Medizin
Herbst 1966 bis Januar 1973
an der Justus Liebig-Universität in Giessen
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 13. April
1967
Ärztliche Vorprüfung am 13. Oktober 1969
Abschluß: Staatsexamen Januar 1973

Wolfgang Diehl

Giessen 1972

LEBENS LAUF

Name: Otto-Jürgen Gensicke

Geburtstag: 20. Juli 1945

Geburtsort: Uslar (Niedersachsen)

Religion: evangelisch

Eltern: Otto Gensicke;
Margarete, geb. Köller
wohnhaft in 63 Giessen, Sandfeld 21

Beruf des Vaters: Oberstleutnant a. D.

Schulbesuch: 1. Ostern 1952 bis Ostern 1956 Volksschule
in Wuppertal-Elberfeld.
2. Ostern 1956 bis Februar 1965
Oberschulen in:
Wuppertal-Elberfeld bis Herbst 1956
Uslar bis Sommer 1957
Koblenz bis Sommer 1959
Holzminden (Niedersachsen) bis Ostern 1960
Böblingen (Württ.) bis Ostern 1962
Arolsen/Waldeck bis Februar 1965
Abschluß: Abitur am 5. 2. 1965

Wehrdienst: Zeitsoldat vom 1. 4. 1965 bis 31. 3. 1967
Entlassung als Leutnant d. Res.

Universität: Studium der Medizin:
April 1967 bis Januar 1973
an der Justus Liebig-Universität Giessen
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 2. April
1968
Ärztliche Vorprüfung am 13. Oktober 1969
Abschluß: Staatsexamen Januar 1973

Jürgen Gensicke
Giessen 1972

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 129 Ruf (0641) 75712